分 类 号：065　　　　　　　　　　　　单位代码：10183

研究生学号：2006332014

吉 林 大 学

硕士学位论文

蛋白质的共振光散射光谱法研究

Studies on proteins by resonance light scattering spectrometry

作者姓名：牧　　丹

专　　业：分析化学

研究方向：光谱分析

指导教师：张寒琦　教授

培养单位：化学学院

2009 年 5 月

蛋白质的共振光散射光谱法研究

studies on proteins by resonance light scattering spectrometry

作者姓名：牧　丹

专业名称：分析化学

指导教师：张寒琦 教授

学位类别：理学硕士

答辩日期：2009 年 5 月 30 日

吉林大学硕士学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：牧丹

日期：2009年 5月 30日

提　要

论文主要研究了共振光散射技术在蛋白质测定中的应用。

第一章介绍了共振光散射光谱法的原理、特点、发展历程、应用等。概述了目前测定蛋白质的方法。

第二章研究了强还原剂（β-巯基乙醇、二硫苏糖醇等）对蛋白质和阴离子表面活性剂十二烷基苯磺酸钠体系共振光散射强度的影响，提出了两种测定蛋白质的共振光散射光谱法。对各物质及其相互作用后的共振光散射光谱进行了详细的研究，证实了使用强还原剂能使半胱氨酸残基之间的二硫键断裂，促进牛血清白蛋白与十二烷基苯磺酸钠之间的结合而可提高体系信号和方法的灵敏度。考查了影响共振光散射强度的各种因素，如 pH、还原剂的浓度、表面活性剂的浓度、试剂的加入顺序和共存物质等。实验结果表明，所建立的共振光散射光谱法可以成功地用于蛋白质的测定。

第三章基于硫酸铵能与蛋白质发生盐析作用，促进蛋白质分子凝聚，形成蛋白质沉淀而引起体系共振光散射强度的增强，建立了一种以硫酸铵为蛋白质的共振光散射探针，快速简便检测蛋白质的新方法。研究了牛血清白蛋白—硫酸铵、人血清白蛋白—硫酸铵和卵清白蛋白—硫酸铵体系的共振光散射光谱，考查了体系的酸度、硫酸铵的饱和度和共存离子等对体系共振光散射强度的影响。将所建立的测定蛋白质的共振光散射光谱法应用到合成样品及实际样品的分析并与传统的考马斯亮蓝法比较，结果令人满意。

关键词：

共振光散射光谱法；蛋白质；还原剂；阴离子表面活性剂；$(NH_4)_2SO_4$

目　录

第一章 前言

蛋白质是生命有机体的主要成分，在生命体生长发育的各个阶段都起着重要作用，是人体及体内一切细胞的基本构成物质，具有调节生理功能、充当药物分子、维生素、矿物质与微量元素的载体、提供给体所需能量的生理功能。同时蛋白质也是生物性状的直接表达者，其含量往往反映有机体的健康状况，是临床检验中诊断疾病的重要依据。所以蛋白质的检测技术一直是与生命科学的发展密切相关的前沿课题之一。随着生命科学对蛋白质检测技术要求的提高，已有的蛋白质检测技术的局限性日益暴露出来。研究普遍适用性好、操作简便、灵敏度高的蛋白质检测新技术显得越来越迫切。

共振光散射（RLS）光谱法是二十世纪 90 年代发展起来的一种新兴的痕量分析测试新技术，该方法灵敏度高、操作简便、选择性较好，已引起了人们的广泛兴趣和关注。近十年来对共振光散射光谱法的研究和应用日益增多，目前这一新技术已广泛应用蛋白质、核酸、塘类、药物、纳米粒子、无机粒子和表面活性剂等的分析研究中，显示了该方法有极广阔的应用前景。 本论文利用简单共振光散射技术研究了蛋白质的测定以及蛋白质与其他物质的相互作用，下边主要介绍共振光散射技术的有关信息。

1.1 光散射现象

光散射作为一种自然现象已长期为人们熟知，例如天空是蔚蓝色的、晚霞是红色的，又如在暗室里将一束强光射过溶液，在光的垂直方向上观察，可以清楚地看到明显的光径等[1]。这些现象都与光被空气中的灰尘、烟雾等微粒散射有关。光散射现象是指光通过介质时在入射光方向以外的各个方向上所观察到的现象。

1.1.1 散射光的产生

光散射现象是电磁辐射与介质相互作用的一种表现形式。光波是一种电磁波，当光照射在某一粒子上时，若粒子的直径小于光的波长，则光波激发

粒子以入射光的频率作简谐运动振动。振动的偶极子相当于次级光源向空间发射的电磁波，这就是散射光源。如果介质是光学不均匀的，分散相与分散介质折光指数相差较大，则产生的诱导偶极矩不同或者因分子热运动引起密度或浓度的局部涨落，使折光指数或介电常数发生局部变化，这两种情况散射光源所产生的次级辐射波不能抵消，就会出现光散射现象[2]。光的散射与介质的不均匀性密切相关，除了真空之外的其它所有介质都有一定程度的不均匀性，从而产生散射光，只是由于介质中粒子大小不同，产生不同种类的散射。

Tyndall 在 1869 年发现一束会聚的光通过溶胶时，则从侧面可以看到一个发光的圆锥体，即 Tyndall 效应。1871 年，Rayleigh 提出了著名的 Rayleigh 散射定律，用电磁波理论解释了小质点光散射的本质[3]。

1.1.2 光散射类型

根据散射辐射频率与入射辐射频率的关系将散射分为弹性散射、非弹性散射和准弹性散射[4]。

(l) 弹性散射(Elasticscattering)：指散射光波长与入射光波长相等的散射，在散射中没有频率位移、无能量损失，又称为经典散射或静态散射。$d \leqslant 20\lambda_0$ 的 Rayleigh 散射、浑浊介质的 Tyndall 散射和透明介质的分子散射都是弹性散射。

(2) 非弹性散射(Inelastieseattering)：是指散射光波长不等于入射光波长的散射，在散射中有频率位移、有能量损失。拉曼散射、布里渊散射属于非弹性散射。发射光波长与入射光波长不同的 Raman 散射是光与分子振动交换能量的非弹性散射，而 Brillouin 散射是由于热声波引起的非弹性散射。其中拉曼散射是现在研究最深入，使用最广泛的光散射。

(3) 准弹性散射(Quasi-elastic light scatering)是指散射光波长与入射光波长有微小差别的散射，是由于散射质点不停的作 Brown 运动所引起的多普勒(Doppler)效应使散射光频率以入射光频率为中心而展宽，即动态光散射射。

根据介质中粒子大小不同，散射可分为 Tyndall 散射和分子散射。当粒子的尺寸大于入射光波长(λ_0)时发生反射和折射并服从光的反射和折射定律。

如果介质中粒子直径(d)与入射光波长相近，便产生 Tyndall 散射，这是由非均相分散体系中的悬浮粒子所产生的光散射，如光与乳状液、悬浮液和胶体溶液作用时发生的光散射；如果介质中粒子很小，如 d≤20λ_0时便产生以 Rayleigh 散射为主的分子散射[4]，分子散射一般要比 Tyndall 散射弱得多。

1.2 共振光散射技术的概述

Rayleigh 散射研究发展 130 多年以来，已建立了较完善的理论体系，并在化学、物理、生物、天文学以及气象学上得到广泛的应用。利用 Rayleigh 散射可以测定蛋白质、DNA 等生物大分子和高分子化合物的相对分子量的大小[5]。对大气 Rayleigh－Mie 散射光进行光谱分析，可获取大气温度、气溶胶含量和风速等大气信息[6]。Rayleigh 散射还可用于测量团簇尺寸[7]。利用激光与流场中分子的 Rayleigh 散射，可测定分子流场的分子密度、流速和温度等物理参数[8]。尽管 Rayleigh 散射技术已得到广泛应用，但该技术信号水平低，一般仅有入射光的千分之一左右，因此必须使用昂贵的激光光源和灵敏的检测器。作为分析手段而言，Rayleigh 散射选择性不是很好。不同物质的 Rayleigh 散射光强度与入射波长的关系均遵守 $I\propto 1/\lambda^4$ 的 Rayleigh 散射定律，没有特征峰，因而限制了它的应用。若在 Rayleigh 散射实验中，选择入射光波长接近待测物质的吸收带时，Rayleigh 散射会大大增强，而且会出现新的散射特征峰。这主要是散射与吸收的共振作用，产生了一个吸收-再散射过程，从而使散射光强度提高几个数量级。这种吸收-再散射的过程称为共振 Rayleigh 散射或者共振光散射[9]。与物理上广泛使用的散射光谱法不同的是，共振光散射光谱法不用激光作为光源，只需要普通荧光分光光度计，调节激发光波长和发射光波长相等，即可测定待测组分发出的共振光散射强度。大量实验表明，共振光散射强度与共振光散射分子的浓度有线性关系，据此可直接进行定量分析。共振光散射光谱法是一种十分简便地用于痕量样品定量分析的高灵敏度方法，它对仪器要求不高，简便、快速，是分子发射光谱领域近年来发展起来的一种非常重要的新方法。对于共振光散射的研究启于 1977 年，当时 Miller 对共振增强光散射的宏观波动理论进行了详细的阐述[10]。

1.2.1 共振光散射技术用于分析测定的的原理

在普通的荧光分光光度计上选择合适的激发和发射通带宽度，以 $\lambda ex=\lambda em$ 同步扫描，即得共振光散射光谱[11-14]。在共振瑞利散射峰处，测量体系的散射光强度(I)和试剂空白溶液的散射光强度(I_o)，则加入待测物后体系散射光的增强程度$\triangle I=I-I_0$。，据待测物浓度和△I 间的线性关系可进行待测物的定量测定。

由于共振光散射光谱是同步光谱，而散射光是源于等波长入射光束激发散射粒子而产生的。因此，可认为散射粒子是和入射光相同波长的新发光体，故共振光散射属于同步发光，其散射光强度遵守同步发光方程[15]:

$$Is=kcbE_{ex}(\lambda_{ex})E_{em}(\lambda_{ex}+\triangle\lambda) \quad (1)$$

式中 E_{ex} 是在给定激发光波长处(λ_{ex})的激发函数，E_{em} 是在对应的发射光波长处的发射函数 ($\lambda_{em}=\lambda_{ex}+\triangle\lambda$)。因为$\triangle\lambda=0$，所以共振光散射强度:

$$I_{RLS}= Is=kcbE_{ex}(\lambda_{ex})E_{em}(\lambda_{ex}) \quad (2)$$

K 是与仪器有关的常数，b 是液池厚度。由此可知，当仪器条件一定时，共振光散射强度与散射粒子的浓度成正比，据此可对散射粒子进行定量测定。

若一种配合物阴离子与阳离子形成离子缔合物，且离子缔合物分子间存在较强的疏水作用力和分子间作用力，则可自发聚集形成较大的微粒，有人将这种微粒称之为离子缔合微粒。有研究表明[16]，较大粒径的离子缔合微粒的形成引起的界面效应可导致 RLS 增强并可能产生新的 RLS 光谱。光散射信号除了与散射质点的大小、形状有关外，还与质点的数目(浓度)有关，利用这种技术，可以研究共振光散射技术在蛋白质测定中的应用。

1.2.2 共振光散射技术的发展历程

光散射现象早已被人类所认识，是一种历史悠久的成熟的分析方法。自其建立以来，经过不断的完善和发展，已广泛应用于高分子聚合物科学，胶体科学及生命科学的研究中。

早在1979年，Anglister等[15]就预言来自吸收带发色团的光散射（共振光散射）会在生物化学及生物学中得到应用。1993年，Pastenack等[17]，首次将共振光散射技术用于卟啉类化合物在核酸分子上堆积的研究。指出了入射辐射与粒子相互作用时，当入射辐射的频率接近其吸收频率，粒子对光的散射程度会明

显增强。这一现象的发现使得通过调节合适的激发、发射狭缝宽度以及合适的激发和发射波长（△λ=0），用一台普通的荧光分光光度计就可实现对共振光散射光谱的测量。这使得测定光散射强度不再局限于使用昂贵的光源，例如激光光源等。同时开启了共振光散射技术在研究发色团自组装或聚沉方面的应用。1995年，Pastenack[18]将共振光散射技术在发色团聚沉研究的应用发表在*Science*。1999年，Pastenack[19]利用共振光散射技术研究了超分子发色团组装的大小、形状及其聚沉数等。1995年，刘绍璞等[20]提出了一种共振发光技术，研究了罗丹明类染料与金属离子的相互作用，发现共振发光峰的位置与染料的结构有关，同时发现增强的共振发光强度与金属离子的浓度之间存在良好的线性关系。1996年，黄承志等[21，22]将共振光散射技术应用到生物分子DNA的检测，1998年，黄承志等又将共振光散射技术应用到了蛋白质的检测，并解释了共振光散射形成的原因[23]。此后，共振光散射技术由于其灵敏度高、操作简便等优点，在生物分子检测方面得到了广泛的应用。其次在金属离子、纳米粒子、表面活性剂、多糖和药物测定等方面也得到广泛的应用。

1.2.3 共振光散射技术的特点

共振光散射光谱法之所以越来越受到人们的广泛关注，是因为共振光散射光谱法与其它的光谱法相比，有如下特点：

(1) 仪器简单

共振光散射光谱法能在普通的荧光分光光度计上进行，不像激光光谱需要特殊的激光光源。大量的试验结果表明，该方法使用的仪器有可能进一步简化，由于该方法不需要复杂的仪器，因而有可能得到微型化、便携式的装置，这在当今仪器分析的发展方向上预计会有新的突破。

(2) 分析速度快

共振光散射光谱分析法一般不需要对样品进行预先的化学处理，避免了一些溶样、配制大量溶液等等一系列烦琐的操作手续。如测定糖原时，可直接把糖原溶于水，直接在普通的荧光分光光度计上测定即可。

(3) 灵敏度高

共振光散射光谱法的灵敏度主要取决于测定时的条件。如在适宜的测定

条件下，用该方法测定核酸和金属离子时，检测限均能达到纳克级。高灵敏度是共振光散射光谱法的一个极其显著的优点。

(4) 应用广泛

共振光散射光谱法既可以用于生命科学领域，又可以用于环境科学与材料科学等领域。采用不同有机染料与蛋白质或核酸等生物大分子结合形成大结合物，可以测定生物大分子。除此之外，共振光散射光谱法还用于金属元素、非金属元素分析和纳米材料粒度分析等领域。共振光散射光谱法可以大大提高测定方法的灵敏度，并且共振光散射光谱法操作简便、测定快速、仪器价廉，因而该方法有望成为分析化学未来发展的方向之一，有望成为现代仪器分析的最强有力的工具之一。

1.2.4 共振光散射技术的应用

共振光散射光谱法是二十世纪90年代发展起来的一种分析测定新技术。自从Pastenack等[17]首次将共振光散射技术成功的应用到卟啉在DNA上聚集的研究开启了共振光散射光谱技术广阔应用前景大门。随着共振光散射技术在理论和分析方法上的日趋成熟，共振光散射技术以其简单的操作，较高的灵敏度广泛应用于蛋白质、核酸、药物、细胞、金属离子、非金属离子、纳米粒子和表面活性剂等的分析。

1.2.4.1 在蛋白质测定中的应用

蛋白质是包括人类在内的各种生物有机体的重要组成成分，是生命的物质基础之一。生物体的生长、发育、遗传和繁殖等一切生命活动都离不开蛋白质。因此研究蛋白质的测定具有及其重要的意义。目前，用于蛋白质测定的方法有很多[24]，有凯氏定氮法（Kjedahl法）、双缩尿法（Biuret法）、Folin-酚试剂法（Lowry法）、紫外吸收法、考马氏亮蓝法、荧光法等，以上方法各有优缺点。共振光散射技术是一种新兴的分析技术，由于其高灵敏性、操作简单、采用普通光源就可以实现等优点被应用于蛋白质的测定。

共振光散射技术用于蛋白质的测定大多基于蛋白质与共振光散射探针相互作用后，引起体系共振光散射强度的急剧增强，增强的散射光强度与被测蛋

白质在一定浓度范围内成正比的原理而建立起来的。共振光散射探针与蛋白质的结合可以通过共价和非共价键完成。目前，作为共振光散射探针的物质有很多种，主要有染料[25、26]、纳米粒子[27]、表面活性剂等[28]。

在共振光散射技术测定蛋白质中，染料分子是最重要的一类共振光散射探针，其研究最早，发展最快。蛋白质是具有等电点的两性电解质，当溶液的pH值小于蛋白质的等电点时，蛋白质带正电荷。染料分子一般是由带负电荷的亲水性基团和不带电荷的疏水基团构成。在酸性条件下，带负电荷的染料分子与质子化的蛋白质之间通过静电作用形成蛋白质—染料的复合物，染料在蛋白质分子上堆积形成较大的粒子，而引起体系共振光散射强度的急剧增强。利用染料分子共振光散射强度的变化与被测蛋白质浓度之间的关系建立起测定蛋白质的方法[25、26]。纳米粒子由于比表面积大易于吸附介质中的带电微粒而带电荷，因而也可以作为测定蛋白质的光散射探针[27]。 表面活性剂在共振光散射技术中的应用主要与带相反电荷的蛋白质结合成较大粒子复合物而对体系共振光散射强度产生增强效应[28]。

1.2.4.2 在核酸测定中的应用

核酸是生物体内一类重要的大分子，它们不仅起着储存，复制和传递遗传信息的作用，而且还决定着细胞的种类及其功能，在生命的起源、生物的遗传变异、物种的进化等方面起着决定性的作用。近年来，现代分子生物学的发展以及分子生物学在临床诊断中的应用，已证明许多疾病的发生，尤其是目前困扰人类的癌症等都与体内的遗传物质—核酸的变化有着密切的关系[29]。因此从生物分析化学的角度对核酸定性，定量检测及其与探针分子作用机理的研究引起了分析工作者的极大兴趣[30]。核酸光谱探针在现代分子生物学、生物医学等领域是一个极其重要的工具，有着广泛的应用。共振光散射技术应用于核酸的研究始于二十世纪九十年代。1993年Pastenack等[17]首次将共振光散射技术应用到卟啉类化合物在核酸分子上堆积的研究，此后吸引了许多科学家的目光。1996年，黄承志等[21]研究发现核酸对水溶性游离碱卟啉TmpyP-4、TAPP的Soret带有减色效应。在低离子强度下，凝聚剂TAPP诱导核酸的超螺旋结构形成，TAPP及质子化的TAPP以聚集态形式堆积于核酸分子表面，体系的共振光散射

强度明显的增强，据此现象建立了测定核酸的共振光散射光谱法，检出限可达纳克水平。随后测定核酸的卟啉类共振光散射探针不断出现。除了卟啉类化合物作为核酸测定的共振光散射探针以外，还有其它类型的共振光散射探针如有机染料[31]、金属络合物[32]、金属纳米粒子[33]、金属离子[34]、表面活性剂[35]、药物分子[36]、杀虫剂[37]、除草剂[38]等。

1.2.4.3 在环境分析中的应用

共振光散射技术除了用于核酸、蛋白质等的分析外，还广泛应用于环境分析中。1995年，刘绍璞等[20]首次利用共振发光法研究了罗丹明类染料与Ce^{4+}、Hg^{2+}和Cd^{2+}等金属离子的相互作用，发现在一定浓度范围内增强的共振发光与金属离子浓度具有良好的线性关系。并预言共振发光法具有研究离子络合物以及测定痕量物质的潜力。由此开创了利用共振光散射光谱法测定痕量无机离子的新领域。随着共振光散射理论研究的不断深入，新的测定金属离子的共振光散射光谱法也不断地出现。

1.2.5 目前发展的新的共振光散射技术

⑴ 基于液\液界面的全内反射共振光散射技术

共振光散射技术是基于散射颗粒与其外部环境之间强烈的折射率变化而建立起来的[17, 18]，微小颗粒吸收或散射光的程度依赖于颗粒的尺寸、形状及其折射率与外部环境介质折射率的差别，而正是这种折射率的差别造成了一个微小界面，这也是散射形成的原因。同时，折射率在光密介质和光疏介质界面上隐失场的形成中起到了关键的作用，这也意味着光的全内反射可以与共振光散射技术结合起来。

液\液界面全内反射共振光散射（TIR-RLS）技术是黄承志等[39]提出的一种新的共振光散射技术。在全内反射模式下，入射光会在液\液界面上发生全内反射产生消失波，能够高度专一的作用于该界面上的物质，产生相应的全内发射共振光散射。此技术引入了全内反射模式和液\液界面，同时具有只有特殊结构的复合物才能够被吸附到液\液界面上的特点，故此技术对物质的测定更具有选择性。此外由于复合物从水相物质中分离，达到了被测物与其他物质分离的目

的。实际上这一分离过程也提高了检测的灵敏度，因为被测物质被富集到了液\液界面，起到了浓缩被检测物的目的。通常情况下，被测物质与其他物质结合形成复合物借助液/液界面反应、协同吸附、共吸附等作用力被吸附于液\液界面，达到与本体相中共存物质分离与富集的效果。与传统的溶液中的共振光散射方法相比较，TIR-RLS方法具有四个优点：（1）将待分析物质萃取到液\液界面并且形成相应的两性物质可以非常有效的减小共存物质的干扰；(2)将待分析物质富集到液\液界面可以有效的提高方法的灵敏度；(3) TIR-RLS法非常适合于研究具有不混溶性质并且也不能被表面活性剂乳化的主体和客体的分子识别；(4)可以用偏振TIR-RLS技术研究液\液界面上的分子定向排列。因此，TIR-RLS是一种非常有前景的新的光谱技术，目前此技术已应用到蛋白质[40]、核酸[41]、药物[42，43]等的测定。例如：金属离子铕既可与氯四环素结合，又可与三辛基氧化膦结合，在液\液界面上形成三元双亲复合物，利用TIR-RLS可实现氯四环素的测定[39]；黄承志等[42]基于十二烷基苯磺酸钠增强维生素B1的全内反射共振光散射信号，建立了测定维生素B1的新方法。同时基于青霉素和黄连素具有协同吸附效应，利用全内反射共振光散射技术实现了对青霉素的定量分析[43]。

⑵ 波长比率共振光散射法

波长比率共振光散射法是近几年发展起一种新技术[44, 45]。Lakowicz等首次提出了波长比率共振光散射技术[44]，并将此技术应用到生物素亲和素免疫反应引起的纳米金粒子聚沉的研究；Roll等[45]借助伴刀豆球蛋白存在会引起葡聚糖包被的胶体金发生聚沉，而葡萄糖的存在会使胶体金发生解聚这一现象，建立了一种检测葡萄糖的波长比率共振光散射技术。此技术的优点在于减小了激发光源的不稳定、漂移及其功率等因素对测量信号的影响。

⑶ 共振光散射成像

普通的共振光散射技术测量的是聚沉粒子的平均光散射信号，无法揭示单个散射微粒的散射信息[46, 47]。共振光散射成像的出现克服了上述缺点，对于一个共振光散射成像仪器，一般包括光源、样品池、CCD 检测器以及数据

处理系统等。成像技术具有高灵敏的特点，但由于溶液中分子的布朗运动以及溶液的不稳定性，会导致测量信号的波动。Huang[46]等研究了以 488nm 氩离子激光器作为发射光源，$TPPS_4$ 在蛋白质模板上的聚集。溶液中的聚集粒子发出的共振光散射信号可以用普通的显微镜观察到，经电感耦合装置收集，并通过对获得的图像的分析发现在焦平面上的聚集体发光点数和溶液中的蛋白质浓度成正比例关系，该方法对人血清中蛋白质的检测限达到 10pg/mL。

⑷ 背向光散射技术

由散射理论知，散射光的强度具有角度依赖性，也就是具有角分布的特点。普通的共振光散射技术检测的是入射辐射和散射辐射成π/2时的散射光强度。在前向和后向，即在入射辐射和散射辐射成0和π时，散射光的强度要比普通共振光散射技术测得的散射光强度大一倍，据此原理背向光散射技术被建立[48]。

⑸ 流动注射技术与共振光散射技术联用

流动注射分析（FIA）是分析化学领域中一项重要的技术和手段，采用把一定体积的试样注入到流动试剂(载液)中的方法，保证混合过程与反应时间的高度重现性，在非平衡状态下高效率地完成了试样的在线处理与测定。流动注射是一种非均匀非平衡状态下的在线进样技术，它所提供信号的广泛性是均匀和平衡体系无法得到的，并且可以用较简单的设备实现分析工作的自动化，提高工作效率，并具有操作灵活且重现性好的特点，得到了广泛的应用。并且流动注射分析速度快，节省试剂和样品，分析系统封闭，可减少了环境对实验的影响。容易实现自动化，重现性好，测定精度可达0.5%～1.0% RSD，多数优于相应的手工操作。

Fernández Band等[49]首次将流动注射与瑞利光散射技术联用应用到蛋白质的测定。Li等[50]以氨基黑10B为荧光探针利用共振光散射与流动注射联用检测人血清样品中蛋白质含量，对HSA的检狈限是0.11 μg/mL,测定试剂样品的回收率在94.9%和105.9%之间。共振光散射与流动注射联用提高了实验的灵敏度和重现性，所得结果令人满意。流动注射技术具有操作简便、重现性好的特点，

与共振光散射技术联用提高了共振光散射技术的自动化程度及方法的精密度、减小了实验的偶然误差、缩短了检测时间。

1.3 目前测定蛋白质的其它方法

蛋白质定量测定是生物化学和其它生物学科中经常涉及的分析内容，也是临床检验中诊断疾病及检查治疗效果的重要指标，又是许多生物药物分离提纯中质量检验及食品检验中常见的项目。蛋白质的含量测定方法很多，包括分光光度法、荧光光度法、化学发光法、紫外光度法、免疫分析法、高效液相色谱法、纳米粒子法和等离子体共振法等。目前研究最多、应用最广、操作比较简便的仍是分光光度法和荧光光度法。

测定蛋白质的分光光度法主要有下列几种：

（1） Bradford检测法（考马斯亮蓝法）

考马斯亮蓝G-250（Coomassie G-250）是一种甲基取代的三苯基甲烷，分子中磺酸基的蓝色染料，在465nm处有最大吸收值。考马斯亮蓝G-250能与蛋白质通过范得华相互作用形成蛋白质—考马斯亮蓝复合物蓝色溶液，引起该染料的最大吸收λmax的位置发生红移，在595nm处有最大吸收值。蛋白质—考马斯亮蓝复合物溶液颜色的深浅与蛋白质的浓度成正比关系，因此可检测595nm处的光吸收值的大小计算蛋白质的含量。此方法反应迅速、呈色反应颜色稳定、干扰物质少、灵敏度高，最低测试蛋白质量在1ug左右。但因染料与不同的纯化蛋白质的相互作用有强有弱[51]。

（2） 双缩脲法

双缩脲法是基于蛋白质的双缩脲反应的方法。在强碱性溶液中，蛋白质与$CuSO_4$反应形成紫红色络合物，最大吸收峰位于540nm处，在一定范围内，吸光度与蛋白质的浓度成正比。该方法操作简便、重现性较好，但灵敏度不高，检出限为0.2～1.7g/L,干扰也比较大[52]。郑铁生等[53]利用双缩脲在碱性条件下与Co(Ⅱ) 、Ni(Ⅱ)、 Zn(Ⅱ)等金属离子结合，建立了Ni(Ⅱ)-双缩脲反应测定血清总蛋白的方法，但灵敏度仍不高。

（3） Lowry法（又名Folin-酚法）

该方法由O.H.Lowry等人[54]1951年建立，Folin-酚试剂与芳香族氨基酸残基Tyr和Try的反应较迅速，而与肽链、极性侧链或两者的铜配合物反应较慢，故可把磷钼酸、磷钨酸发色团还原成暗蓝色，最大吸收峰在750nm处，一定条件下，吸光度与蛋白质浓度成正比。方法的线性范围较宽（500～1000mg/mL），检出限为0.1mg/mL，操作简便，但也存在灵敏度低，费时费力，干扰影响大等缺点。

(4) 4-喹啉甲酸（2，2'-Bicinchoninic acid）法（BCA法）

该方法是80年代发展起来的新的吸光光度法[55]，在碱性溶液中，蛋白质将Cu(Ⅱ)还原为Cu(Ⅰ), Cu(Ⅰ)与BCA形成紫红色配合物，最大吸收峰由400nm红移至562nm处，在一定条件下，配合物的吸光度与蛋白质的浓度成正比。该方法的灵敏度较高，检出限达到0.5～10μg/mL，对不同蛋白质的测定值变化较小[56]，但受葡萄糖干扰较大，可用于脑脊液等样品中微量蛋白质的测定[57]。

1.4 本论文的主要内容

蛋白质是生命现象中最基本的物质，在生命活动中起着重要的作用，具有各种生理功能。同时蛋白质也是生物性状的直接表达者，其含量往往反映机体的健康状况，是临床检验中诊断疾病的重要依据。蛋白质的测定成为生命科学研究的一个重要课题。目前测定蛋白质的方法有很多种，如凯氏定氮法、双缩尿法、Folin-酚试剂法、紫外吸收法、考马氏亮蓝法、荧光法等，这些方法各有优缺点。因此，寻找一种简单、快速、高灵敏的测定蛋白质的方法以及研究蛋白质与其测定探针之间的相互作用变得尤为重要。本论文通过利用具有灵敏度高、操作简便的共振光散射技术研究了三种测定蛋白质的方法。

1.4.1 蛋白质—还原剂—阴离子表面活性剂体系

在共振光散射光谱法测定蛋白质中，表面活性剂主要是以使体系共振光散射强度产生增强效应的形式出现。对于阴离子表面活性剂十二烷基苯磺酸

钠和蛋白质体系的共振光散射光谱的研究已有报道。本文在此基础上研究了强还原剂 β-巯基乙醇和二硫苏糖醇对牛血清白蛋白和十二烷基苯磺酸钠体系共振光散射强度的影响。在酸性条件下，阴离子表面活性剂十二烷基苯磺酸钠通过静电相互作用与带正电荷的牛血清白蛋白结合形成二元配合物，使体系的共振光散射强度产生增强效应，当体系中加入还原剂 β-巯基乙醇和二硫苏糖醇时，体系的共振光散射强度会有更加明显的增强。据此提出了两种简单、快速、高灵敏度的测定牛血清白蛋白的共振光散射光谱法。考查了各种因素对体系共振光散射强度的影响，如酸度、还原剂和表面活性剂的浓度、共存离子等。将该方法应用到合成样品以及实际样品的分析，结果令人满意。

1.4.2 蛋白质—硫酸铵体系

基于硫酸铵能与蛋白质发生盐析作用，促进蛋白质分子凝聚，形成蛋白质沉淀而引起体系共振光散射强度的增强，建立了一种前人未曾研究过的以硫酸铵为蛋白质的共振光散射探针，快速简便检测蛋白质的新方法。具体研究了以硫酸铵为共振光散射探针提出了检测牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)和卵清白蛋白(OVA)的方法，考查了体系的酸度、硫酸铵的浓度和共存离子等对体系共振光散射强度的影响。将所建立的测定蛋白质的共振光散射光谱法应用到合成样品及实际样品的测定，结果令人满意。

1.5 参考文献

[1] 蒋治良. 纳米粒子与共振散射光谱学[M]. 桂林：广西师范大学出版社，2003：p26

[2] 赵凯华, 钟锡华, 等. 光学, 下册[M]. 北京：北京大学出版社, 1982：p249-252.

[3] C.F.Bohren,D.R.Huffman,Absorption Scattering of Light by Small Particals,New York:John Wiley and Sons,1983,4

[4] 张寒琦等译. 光谱化学分析[M]. 吉林：吉林大学出版社, 1996：p 530-563.

[5] 陈宗淇，戴闽光，等. 胶体化学[M]. 北京：高等教育出版社，1984：p219

[6] G.Fiocco,J.B.Dewolf,Frequency spectrum of laser echoes form atmospheric

constituents anddeter-mination of the aerosol content of air.J.Atm.Sic.,1968,25(3)：488～496

[7] 张生佳，翟华金，倪国权，等. 瑞利散射法诊断大尺寸团簇[J]. 激光与光电子学进展，1999, 405（9）：7～13

[8] R.Miles,W.Lempert.Two-dimensional measurement of density,and temperature in turbulent High-speedair flows by UV Rayleith scattering.Appl.Phys.,1990,B(51):1～7

[9] AnglisterJ.，Steinberg.I.Z..J.Resonance Rayleigh scattering of Cyanine Dyes insolution.Chem.Phys[J],1983,78(9):5358-5368

[10] Miller, G. A., Fluctuation Theory of the Resonance Enhancement of Rayleigh Scattering in Absorbing Media. The Journal of Physical Chemistry 1977**,** 82, (5), 616-618

[11] 黄承志，李原芳，黄新华，范美坤，等. 单链脱氧核糖核酸探针在羧基聚苯乙烯小珠表面的微阵列条件及固一液杂交特性[J]. 分析化学，2000, 28(11)：1344-1349

[12] Huang C.Z.，Li K.A.，Tong S.Y.，Determination of Nanograms of NucleicAcids by Their Enhancement Effect on the Resonance Light Scattering of the Cobalt(Il)/4-[(5-Chloro-2-pyridyl) azo]-1,3-diaminobenzene Complex., Anal. Chem.,1997, 69 (3):514—520、

[13] Huang C.Z，Zhu J.X.,Li K,A，Tong S.Y., Determination of Albumin and Globulin at Nanogram Levels a Resonance Light-Scattering Technique with a,(3,y,S-Tetrakis(4-sulfophenyl)porphine. Anal. Sci., 1997, 13 (2):263-268

[14] 赵建林，光学[J]. 北京：高等教育出版社，2006： p 327-332.

[15] Anglister J，Steinberg I.Z. Depolarized Rayleigh light scattering in absorption bands measured in lycopene solution. Chem. Phys. Lett，1979, 65: 50-5416.

[16] 蒋治良. 无机纳米微粒体系的共振瑞利散射光谱研究及分析新应用[D].

西南：西南师范大学博士学位论文，2003.

[17] Pasternack, R. F.; Bustamante, C.; Collings, P. J.; Giannetto, A.; Gibbs, E. J., Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique Journal of the American Chemical Society 1993**,** 115, 5393-5399.

[18] Pasternack, R. F.; Collings, P. J.,Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation Science 1995**,** 269, 935.

[19] Collings, P. J.; Gibbs, E. J.; Starr, T. E.; Vafek, O.; Yee, C.; Pomerance, L. A.; Pasternack, R. F., Resonance light scattering and its application in determining the size, shape, and aggregation number for supramolecular assemblies of chromophores. Journal of Physical Chemistry *B* 1999**,** 103, (40), 8474-8481

[20] Liu, S. P.; Liu, Z. F., Studies on the resonance lumminescence spectra of rhodamine dyes and their ion-association complexes. Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy 1995**,** 51, 1497-1500.

[21] Huang, C. Z.; Li, K. A.; Tong, S. Y., Determination of Nucleic Acids by a Resonance Light-Scattering Technique with α,β,γ,δ-Tetrakis[4-(trimethylammoniumyl)phenyl]porphine Anal. Chem. 1996**,** 68, (13), 2259-2263.

[22] Huang, C. Z.; Li, K. A.; Tong, S. Y., Determination of Nanograms of Nucleic Acids by Their Enhancement Effect on the Resonance Light Scattering of the Cobalt(II)/4-[(5-Chloro-2-pyridyl)azo]-1,3-diaminobenzene Complex. Anal. Chem. 1997**,** 69, (3), 514-520.

[23] Huang, C. Z.; Li, Y. F.; Mao, J. G.; Tan, D. G., Determination of protein concentration by enhancement of the preresonance light-scattering of α,β,γ,δ-tetrakis(5-sulfothienyl)porphine. The Analyst 1998**,** 123, 1401-1406.

[24] 陈钧辉，陶力，李俊，等. 生物化学实验[M]. 北京:科学出版社，2006:

P51-63、

[25] Ma, C. Q.; Li, K. A.; Tong, S. Y., Microdetermination of Proteins by Resonance Light Scattering Spectroscopy with Bromophenol Blue. Analytical Biochemistry 1996, 239, (1), 86-91. 、

[26] Huang, C. Z.; Li, Y. F.; Feng, P.; Li, M., Determiantion of proteins by their enhancement of resonance light scattering by fuchsine acid. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 2001, 371, (7), 1034-1036.

[27] Chen, H. Q.; Xu, F. G.; Hong, S.; Wang, L., Quantitative determiantion of proteins at nanogram levels by the resonance light-scattering technique with composite nanoparticles of CdS/PAA. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2006, 65, (2), 428-432.

[28] Chen, Y.-j.; Yang, J.-h.; Wu, X.; Wu, T.; Luan, Y.-x., Resonance light scattering technique for the determination of proteins with resorcinol yellow and OP. Talanta 2002, 58, (5), 869-874.

[29] 张昌颖主编. 生物化学[M]. 北京：人民卫生出版社，1993：p56

[30] Cunguo Lin, Jinghe Yang , Xia Wu, Guiling Zhang, Rutao Liu, Xihui Cao, Rongjiang Han，Enhanced fluorescence of the terbium–gadolinium–nucleic acids system and the determination of nucleic acids, anal chim acta,2000,403,219-224

[31] Wang, M.; Yang, J. H.; Wu, X.; Huang, F., Study of the interaction of nucleic acids with acridine red and CTMAB by a resonance light scattering technique and determination of nucleic acids at nanogram levels. Analytica Chimica Acta 2000, 422, (2), 151-158.

[32] Jia, Z.; Yang, J.; Wu, X.; Sun, C.; Liu, S.; Wang, F.; Zhao, Z., The sensitive determination of nucleic acids using resonance light scattering quenching method. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular

Spectroscopy 2006, 64, (3), 555-559.

[33] Li, L.; Song, G. W.; Fang, G. R.; Xin, L.; Li, B. J., Synthesis of a resonance light scattering probe Fe(phen)(dpy)SO_4 and its application to the determination of deoxyribonucleic acid. Chinese Journal of Analytical Chemistry 2003, 31, (10), 1277-1277.

[34] Li, Y. X.; Chen, J. L.; Zhuo, S. J.; Wu, Y. Q.; Zhu, C. Q.; Wang, L., Application of L-cysteine-capped ZnS nanoparticles in the determination of nucleic acids using the resonance light scattering method. Microchimica Acta 2004, 146, (1), 13-19.

[35] Yang, C. X.; Li, Y. F.; Feng, P.; Huang, C. Z., Study on the interaction of alaminum ion with deoxyribonucleic acid by resonance light scattering measurement. Chinese Journal of Analytical Chemistry 2002, 30, (4), 473-477.

[36] Liu, R. T.; Yang, J. H.; Sun, C. X.; Wu, X.; Gao, X. B.; Liu, Y.; Liu, S. F.; Su, B. Y., Resonance double light scattering method for the determination of nucleic acids with cetylpyridine bromide. Microchimica Act*a* 2004, 147, (1-2), 105-109.

[37] Feng, S.; Li, Z. P.; Zhang, S. H.; Fang, Z., Study on interaction of adriamycin and DNA with a resonance light scattering technique and its DNA analytical application. Spectroscopy and Spectral Analysis 2006, 26, (4), 707-710.

[38] Jia, G. F.; Wang, P.; Qiu, J.; Sun, Y.; Xiao, Y. M.; Zhou, Z. Q., Determination of DNA with imidacloprid by a resonance light scattering technique at nanogram levels and its application. Analytical Letters 2004, 37, (7), 1339-1354.

[39] Feng, P.; Shu, W. Q.; Huang, C. Z.; Li, Y. F., Total internal reflected resonance light scattering determination of chlortetracycline in body fluid with the

complex cation of chlortetracycline-europium-trioctyl phosphine oxide at the water/tetrachloromethane interface. Analytical Chemistry 2001, 73, (17), 4307-4312.

[40] Huang, C. Z.; Feng, P.; Li, Y. F.; Zhao, H. W., Determination of proteins by measuring total internal-reflected resonance light scattering signals on water/tetrachloromethane interface with Evans Blue and cetyltrimethylammonium bromide. Chemical Research in Chinese Universities 2005, 21, (4), 426-430.

[41] Huang, C. Z.; Lu, W.; Li, Y. F., Total internal reflected resonance light scattering detection of DNA at water/tetrachloromethane interface with acrindine orange and cetyltrimethylammonium bromide. Analytica Chimica Acta 2003, 494, (1-2), 11-19.

[42] Lu, W.; Huang, C. Z.; Li, Y. F., Novel assay of thiamine based on its enhancement of total internal reflected resonance light scattering signals of sodium dodecylbenzene sulfonate at the water/tetrachloromethane interface. Analytica Chimica Acta 2003, 475, (1-2), 151-161.

[43] Huang, C. Z.; Feng, P.; Li, Y. F.; Tan, K. J.; Wang, H. Y., Adsorption of penicillin-berberine ion associates at a water/tetrachloromethane interface and determination of penicillin based on total internal-reflected resonance light scattering measurements. *Analytica Chimica Acta* 2005, 538, (1-2), 337-343.

[44] Roll, D.; Malicka, J.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; Lakowicz, J. R., Metallic Colloid Wavelength-Ratiometric Scattering Sensors. *Anal.* Chem. 2003, 75, (14), 3440-3445.

[45] Aslan, K.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D., Nanogold Plasmon Resonance-Based Glucose Sensing 2. Wavelength-Ratiometric Resonance

Light Scattering. Anal. Chem. 2005, 77, (7), 2007-2014.

[46] Huang, C. Z.; Liu, Y.; Wang, Y. H.; Guo, H. P., Resonance light scattering imaging detection of proteins with α,β,γ,δ-tetrakis(p-sulfophenyl)porphyrin Analytical Biochemistry 2003, 321, (2), 236-243.

[47] Liu, X. D.; Huang, C. Z.; Guo, H. P.; Huang, Y. M., Resonance light scattering imaging detection of single suprahelical species of DNA induced by porphine-5,10,15,20-tetrakis(p-phenyltrimethylaminium). Chinese Journal of Chemistry 2006, 24, (1), 89-94.

[48] Wang, Y. H.; Guo, H. P.; Tan, K. J.; Huang, C. Z., Backscattering light detection of nucleic acids with tetraphenylporphyrin-Al(III)-nucleic acids at liquid/liquid interface. Analytica Chimica Acta 2004, 521, (1), 109-115.

[49] Vidal, E.; Palomeque, M. E.; Lista, A. G.; Band, B. S. F., Flow injection analysis: Rayleigh light scattering technique for total protein determination Analytical and Bioanalytical Chemistry 2003, 376, 38-41.

[50] Li Y, Dong L J, Zhang Y H,Hu Z K,Chen X G. Determination of proteins by flow injection analysis coupled with the Rayleigh light scattering technique [J].Talanta,2007.71(1):109-114

[51] 汪家政，范明，等. 蛋白质技术手册[M]. 北京：科学出版社， 2002： p42—47

[52] 喻红，彭芳芳，刘芳，等. 医学生物化学与分子生物学实验技术[M]. 武汉：武汉大学出版社，2003：p85

[53] 郑铁生，狄兆俊，张萍，等. 镍-双缩脲反应测定血清总蛋白质方法学研究[J]. 临床检验杂志，1992，10（4）：174～176

[54] Lowery O H,.Resebrough N J,Lewis Farr A,Randall R J.J.Biochem.,1951,193:265～275

[55] Smith P K,Krohn R I,Hermanson G T,Mallia A K,et al.Anal.biochem.1985,150:76～85

[56] 周祖钊，朱文雅，彭小玲，等. BCA 法测定微量蛋白质的初步评价[J]. 临床检验杂志，1992，10（3）：134～135

[57] 陈鸿琪. 蛋白质定量分析的进展[J]. 理化检验-化学分册，2000，36（7）：333

第二章 蛋白质-还原剂-表面活性剂体系

蛋白质是人们认识细胞功能和疾病过程的关键，是生命科学的基础。蛋白质含量的测定在临床医学、生命科学的研究方面有着十分重要的意义。目前测定蛋白质的方法有凯氏定氮法（Kjedahl 法）、双缩尿法（Biuret 法）、Folin-酚试剂法（Lowry 法）、紫外吸收法、考马氏亮蓝法和荧光法等。以上方法各有优缺点，凯氏定氮法干扰少，但耗时长，一般需要 8-10 小时左右。双缩尿法适用于快速测定，但是不够灵敏。紫外吸收法主要应用于层析柱流出的蛋白质的测定。Lowry 法需要严格控制时间[1]。

共振光散射光谱法是近几年发展起来的新的分析技术。方法简单，灵敏度高，可以用普通的荧光分光光度计测量，因此在蛋白质[2]和核酸[3]等生物大分子的研究中得到了广泛的应用。Pastenack 等[4-6]首次将共振光散射光谱作为一种技术研究卟啉类化合物在核酸分子上的堆积。指出入射光与粒子相互作用时，入射光的频率接近其吸收频率，粒子对光的散射程度明显增强。即当入射光的波长接近分子最大吸收波长时，散射微粒对光的散射程度明显的增强。这一发现使得通过调节合适的激发、发射狭缝宽度以及合适的激发和发射波长（$\Delta\lambda=0$），用一台普通的荧光分光光度计就可以达到对共振光散射光谱的测量。因此测定光散射的强度不再局限于使用昂贵的光源，例如激光光源等。自此以后，共振光散射技术由于其高灵敏性、操作简单、采用普通光源就可以实现等优点被广泛的应用于生物大分子、药物分子、无机离子等的测定。表面活性剂与蛋白质通过静电引力形成聚合物，体系的共振光散射强度会发生明显的增强，且增强的共振光散射强度与蛋白质的浓度在一定浓度范围内具有良好的线性关系，据此原理建立测定蛋白质的共振光散射光谱法。

表面活性剂具有增溶、催化、乳化、分散、聚集、起泡、消泡等作用，广泛地被应用于洗涤剂、化妆品、制药、制浆造纸、纺织、化学纤维、制革、食品、塑料等工业。近年来，表面活性剂受到分析科学家的重视，将其应用到共振光散射光谱法测定生物大分子的测定中。表面活性剂主要以两种方式应用于

生物大分子的测定，其一，利用表面活性剂本身与生物大分子结合的性质，直接作为共振光散射探针应用到生物大分子的研究中。如利用十六烷基三甲基溴化铵和溴化十六烷基嘧啶共振光散射探针直接测定溶液中的核酸[7,8]。其二，作为共振光散射强度的增强剂应用于共振光散射体系，其中既包括离子型表面活性剂也包括非离子型表面活性剂[9,10]。如非离子型表面活性剂OP和Triton X-100。

本章基于在蛋白质溶液中加入阴离子表面活性剂十二烷基苯磺酸钠和带巯基的强还原剂（β-巯基乙醇、二硫苏糖醇）时，体系的共振光散射强度增强现象，设计了测定蛋白质的快速、简便、灵敏的共振光散射光谱法。其中表面活性剂作为阴离子去污剂会断裂蛋白质分子内和分子间的氢键，使分子去折叠，破坏蛋白质分子的二级和三级结构[11]，与蛋白质分子形成蛋白质—阴离子表面活性剂的二元配合物。强还原剂可以打开蛋白质分子内的二硫键，使其分解为亚基[12]，促进蛋白质与阴离子表面活性剂的结合而导致了蛋白质—还原剂—阴离子表面活性剂体系的共振光散射强度比蛋白质—阴离子表面活性剂体系的强。具体研究了牛血清白蛋白(BSA)-β-巯基乙醇(β-ME)-十二烷基苯磺酸钠(SDBS)体系和BSA-二硫苏糖醇(DTT)-SDBS体系的共振光散射光谱并建立了两种测定蛋白质的共振光散射光谱法。考查了各种因素对体系共振光散射强度的影响，如酸度、表面活性剂的浓度、还原剂的浓度、试剂的加入顺序、共存离子等。将所建立的测定蛋白质的共振光散射光谱法应用到合成样品和实际样品的测定，结果令人满意。

对于阴离子表面活性剂SDBS和蛋白质体系的共振光散射光谱的研究已有报道[13.14]。本文在此基础上研究了还原剂 β-ME 和 DTT 对 BSA— SDBS 体系共振光散射强度的影响。结果证明使用 β-ME 和 DTT 可提高信号和方法的灵敏度。

2.1 实验部分

2.1.1 仪器与试剂

2.1.1.1 仪器

RF-5301 PC荧光分光光度计（日本岛津公司）、GBC Cintra 10e 紫外-可见分光光度计（澳大利亚GBC仪器公司）、DELTA 320 pH计（上海梅特勒-托利多仪器有限公司）。

2.1.1.2 试剂

1.1×10^{-5} $molL^{-1}$BSA（购自上海生物制品有限公司）储备液用二次水配制，并在4℃下保存。0.01 $molL^{-1}$SDBS（购自天津市光复精细化工研究所）储备液用二次水配制备用。β-ME购自北京鼎国生物试剂有限公司。用不同比例的0.2 $molL^{-1}$的磷酸氢二钠溶液以及0.1 $molL^{-1}$ 的柠檬酸溶液控制反应体系的酸度，其它试剂均为分析纯。

2.1.2 实验方法

2.1.2.1 牛血清白蛋白—β-巯基乙醇—十二烷基苯磺酸钠体系

在10 mL比色管中依次加入适量的BSA溶液、缓冲溶液和β-ME溶液后振荡混匀，再加入适量的SDBS溶液，最后用二次去离子水定容，放置10min后进行测定。

2.1.2.2 牛血清白蛋白—二硫苏糖醇—十二烷基苯磺酸钠体系

在10 mL比色管中依次加入适量的BSA溶液、缓冲溶液和DTT溶液后振荡混匀，再加入适量的SDBS溶液，最后用二次去离子水定容，放置10min后进行测定。

2.1.3 仪器参数

采用RF-5301 PC荧光分光光度计，在220 nm～800 nm 波长范围内同步扫描($\lambda ex = \lambda em$)，激发和发射狭缝均为3 nm。在最大共振光散射波长处测量样品液（BSA—β-ME—SDBS）的共振光散射强度I_{RLS}和空白（β-ME—SDBS）的共振光散射强度 I^0_{RLS} ，由测得的I_{RLS}和I^0_{RLS}，可得到增强的共振光散射强度ΔI_{RLS}，即$\Delta I_{RLS} = I_{RLS} - I^0_{RLS}$。

2.2 BSA—β-ME—SDBS 体系共振光散射光谱的研究

2.2.1 BSA—β-ME—SDBS 体系的光谱特征

由图2-1可知，在pH=2.4， c(BSA)=4.5×10^{-7}molL^{-1}，c(β-ME)=0.71 molL^{-1}和c(SDBS)=6.5×10^{-4}molL^{-1}的条件下，BSA、β-ME、SDBS、BSA—β-ME和β-ME—SDBS体系的共振光散射强度较弱，而BSA—SDBS体系和BSA—β-ME—SDBS体系在357 nm和545 nm波长处的共振光散射强度较强。较强共振光散射峰的出现说明带正电荷的BSA与阴离子表面活性剂通过静电引力形成了BSA-SDBS二元配合物。图2-1中曲线7表明当BSA—β-ME—SDBS三者混合时体系的共振光散射强度明显比BSA-SDBS二元配合物体系的共振光散射强度强。这一现象归因于还原剂β-ME能使半胱氨酸残基之间的二硫键断裂[12]，促进BSA与SDBS之间的结合而增强了体系的共振光散射强度。由于357 nm处的共振光散射强度比545 nm处的更强，因此本文选择357 nm作为共振光散射强度的测定波长。

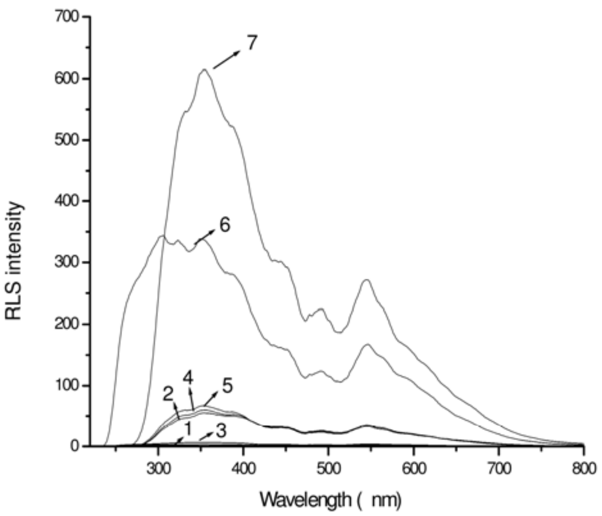

Fig.2-1.The RLS spectra of various systems 1．BSA, 2.β-ME, 3.SDBS, 4. BSA-β-ME, 5.β-ME-SDBS, 6.BSA-SDBS ,7.BSA-β-ME-SDBS,

2.2.2 条件的优化

2.2.2.1 酸度的影响

BSA和SDBS是通过静电作用力而结合的，所以体系的pH值对共振光散射强度的影响非常重要。本文采用磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲体系来控制反应体系

的酸度，在c(BSA)= 4.5×10^{-7} molL^{-1}、c(β-ME)=0.71 molL^{-1}和c(SDBS)=6.5×10^{-4} molL^{-1}条件下研究了pH值变化对体系共振光散射强度的影响(图2-2)。由图2-2可知，β-ME—SDBS体系的共振光散射强度很低，并随pH值的增大而没有明显的变化。BSA—β-ME—SDBS体系共振光散射强度较高，并随pH值的增大而有明显的变化。当溶液的pH＜2.0时，BSA—β-ME—SDBS体系的共振光散射强度随pH值的增大而增强，当pH在2.0～3.0范围内时达到最大值。I_0为BSA的等电点，pI_0=4.9，当pH＜pI_0时BSA带正电荷与阴离子表面活性剂通过静电引力而很容易结合形成BSA—SDBS二元配合物。当pH＞4时共振光散射强度开始减弱，当pH=pI_0时共振光散射强度降低到与空白相近，并随pH值的增大而没有明显的变化，说明pH＞pI_0时BSA带负电荷，与阴离子表面活性剂发生静电排斥作用而很难结合形成BSA—SDBS二元配合物。基于实验结果，本文选用pH=2.4的缓冲溶液来控制反应体系的酸度。

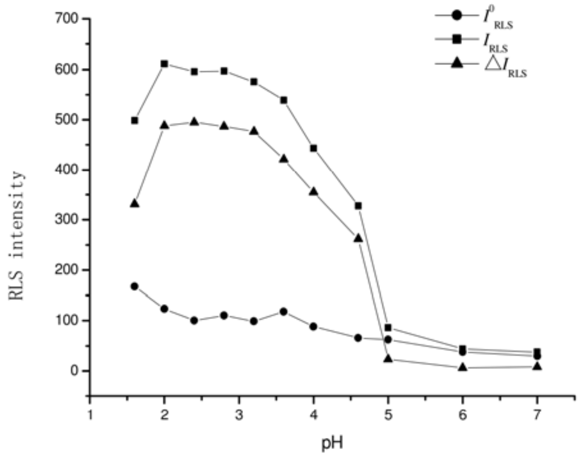

Fig. 2-2. Effect of pH value on RLS intensity

2.2.2.2 β - ME 浓度的影响

β- ME的引入导致BSA—SDBS体系的共振光散射强度明显增强。本实验在pH=2.4，c (BSA)=4.5×10^{-7}molL^{-1}和c（SDBS）= 6.5×10^{-4}molL^{-1}条件下，考查了β- ME的浓度对体系的共振光散射强度的影响。结果如图2-3所示，β- ME的浓度小于0.71 molL^{-1}时，体系的共振光散射强度随β- ME浓度的增大而增强，β-ME的浓度在0.71～1.1 molL^{-1}范围内时达到最大值，β- ME的浓度大于1.1

$molL^{-1}$时，随着β- ME浓度的增加共振光散射强度减弱。因此本文选0.71 $molL^{-1}$为β- ME的最佳浓度。

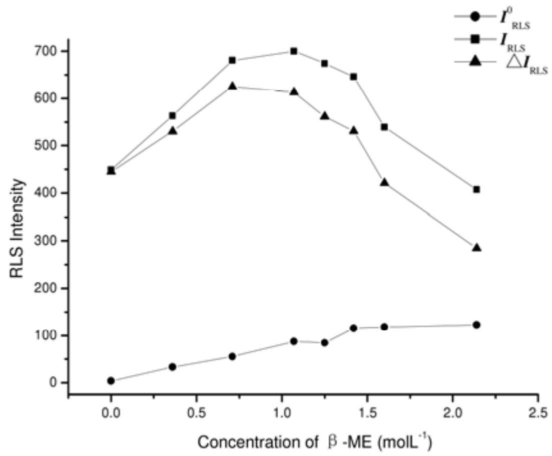

Fig.2-3. Effect of concentration of β-ME on RLS intensity

2.2.2.3 SDBS 浓度的影响

由于体系的共振光散射强度增强是因为形成BSA—SDBS二元配合物引起的。实验中考察了SDBS浓度对BSA—β- ME—SDBS体系共振光散射强度的影响。如图2-4所示，SDBS浓度改变并未引起β- ME—SDBS体系共振光散射强度明显的变化。但SDBS浓度的变化引起BSA—β- ME—SDBS体系共振光散射强度发生了明显的变化。当SDBS浓度小于5.5×10^{-4} $molL^{-1}$时，体系的共振光散射强度随着SDBS浓度的增大而增强。这是由于阴离子表面活性剂在水溶液中以单体和胶束的混合形式存在，其中单体破坏蛋白质的氢键和疏水键并定量结合到蛋白质分子上。在表面活性剂的浓度较低时，单体的浓度随着表面活性剂总浓度的增加而增加，与蛋白质结合的程度也增强[15]。当SDBS的浓度大于7.5×10^{-4} $molL^{-1}$时，体系的共振光散射强度随SDBS浓度的增大而降低。当表面活性剂的浓度达到一定值时，随表面活性剂的总浓度的增加，单体的浓度不再变，只增加胶束的浓度[15]。由于胶束的增加，单体与蛋白质的结合程度也相对的减少而引起体系共振光散射强度的下降。当SDBS的浓度5.5×10^{-4} $molL^{-1}$～7.5×10^{-4} $molL^{-1}$范围时，体系的公正光散射强度达到且保持不变，基于上述讨论，本实验选择6.5×10^{-4} $molL^{-1}$作为SDBS的最佳浓度。

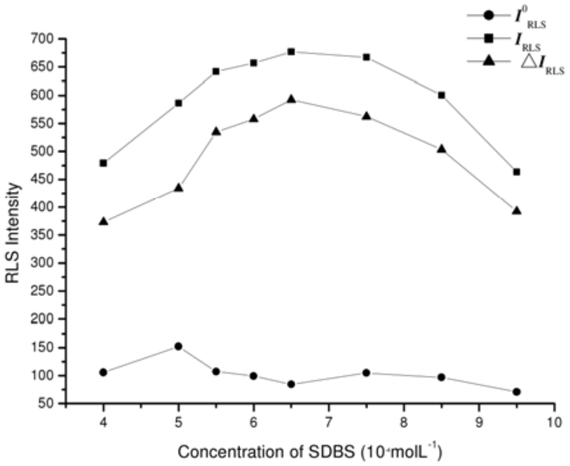

Fig. 2-4. Effect of concentration of SDBS on RLS intensity

2.2.2.4 试剂加入顺序的影响

在体系的pH值以及BSA、β-ME和SDBS浓度固定的条件下，考查了β-ME与SDBS的加入顺序对体系共振光散射强度的影响。结果表明，在含有BSA的缓冲溶液中先加入β-ME时体系共振光散射强度为100%，则先加入SDBS时体系共振光散射强度为87%，当体系中不加β-ME, 在含有BSA的缓冲溶液中加入SDBS时体系的共振光散射强度为84%。此现象说明对体系共振光散射强度的增强β-ME起着重要作用，因为β-ME能打开蛋白质分子内的二硫键，使其分子分解为亚基[11]，促进BSA与SDBS更有效的结合。因此在实验中依次加入BSA、缓冲溶液、β-ME和SDBS。

2.2.3 共存物质的影响

在BSA浓度为4.5×10^{-7} molL^{-1}时，研究了几种共存离子对测定的干扰。由表2-1可知，BSA对金属离子抗干扰能力有较大差别，Na^+、 Ba^{2+} 等离子对测定干扰较小，但过高浓度的Al^{3+}离子对测定有一定干扰。

2.2.4 标准曲线

在最佳的实验条件下, 体系的共振光散射强度随着BSA浓度的增大而增强, BSA的浓度c在1.0×10^{-8} molL^{-1}～7.0×10^{-7} molL^{-1}范围时，c与体系的共振光散

Table 2-1 The influence of foreign substances

Foreign subustances	Concentration ($\times10^{-4}$ molL^{-1})	The concentration of BSA found ($\times10^{-7}$molL^{-1})	Relative error (%)
NaCl	1.0	4.98	-1.07
kCl	1.0	4.46	-0.89
$CaCl_2$	1.0	4.42	-1.78
$MgSO_4$	1.0	4.64	-3.11
$ZnSO_4$	1.0	4.77	6.00
$BaCl_2$	1.0	4.48	-0.44
$Cr(NO_3)_3$	1.0	4.62	2.67
$Al_2(SO_4)_3$	0.05	4.89	8.67
Glucose	1.0	4.92	9.33

射强度增强ΔI_{RLS}具有良好的线性关系如图2-5所示，c与ΔI_{RLS}的关系式可表示为：$\Delta I_{RLS} = -42.1+1.37\times10^9 c$, 相关系数为0.9945，检出限为$6.0\times10^{-9}$ molL^{-1}。

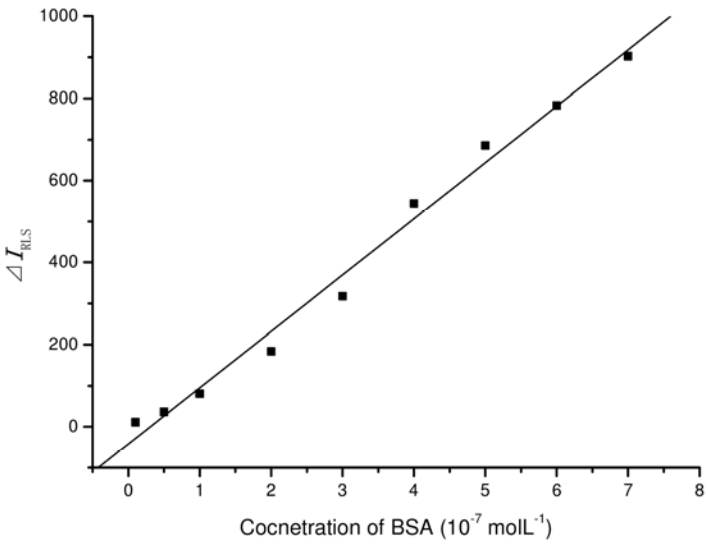

Fig2-5 The plot of ΔI_{RLS} value vs. concentration of BSA.

2.2.5 样品分析

2.2.5.1 合成样品的分析

为了证明方法的可行性，并考虑到生物样品中与蛋白共存的组分常有Na^+、K^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Cl^-、SO_4^{2-}等，且浓度都较高，所以合成了三种含有不同干扰组分的样品，按上述方法实验，结果如表2-2所示，测定结果与考马斯亮蓝

法（Coomassie Brillant blue,CBB法）测得的结果一致，且有较好的回收率。

Table2- 2 Determination of bovine serum albumins in synthetic samples

Foreign Substance[a]	The concentration of BSA found （$\times10^{-7}$ molL^{-1}）		Recovery（%）		RSD （%）	
	RLS	CBB	RLS	CBB	RLS	CBB
NaCl $CaCl_2$ $BaCl_2$	6.12	6.16	102.0	103.0	2.0	2.6
KCl $ZnSO_4$ $MgSO_4$	5.92	5.93	98.7	98.8	-1.2	-1.2
$CaCl_2$ $ZnCl_2$ $Al_2(SO_4)_3$	5.85	6.06	97.5	101.0	-2.4	1.0

The concentration of BSA in sample is 6.0×10^{-7}molL^{-1}.

[a] The concentrations of NaCl，KCl，$ZnSO_4$， $CaCl_2$， $MgSO_4$ ，$BaCl_2$and $Al_2(SO_4)_3$ were 1.0×10^{-4}molL^{-1}，respectively.

2.2.5.2 人血清样品的分析

利用该方法对正常人血清（吉林大学第一附属医院提供）中的总蛋白质含量进行了测定。测定前将新鲜的血清用二次蒸馏水逐级稀释 500 倍后取适量溶液，按实验方法进行测定，用RLS法测得总蛋白的含量为31.93 gL^{-1}，用考马斯亮蓝法（CBB法）测得总蛋白的含量为31.42 gL^{-1}，结果一致。

2.3 BSA—DTT—SDBS 体系共振光散射光谱的研究

2.3.1 BSA—DTT—SDBS 体系的光谱特征

由图2-6可知，在pH=2.4，c(BSA)=4.5×10^{-7}molL^{-1}，c(DTT)=0.5molL^{-1}和c(SDBS)=6.5×10^{-4}molL^{-1}的条件下，BSA、DTT、SDBS、BSA—DTT和DTT—SDBS体系的共振光散射强度较弱，而BSA—SDBS体系和BSA—DTT—SDBS体系在357 nm和545 nm波长处的共振光散射强度较强。较强共振光散射峰的出现说明带正电荷的BSA与阴离子表面活性剂通过静电引力形成了BSA-SDBS二元配合物。图2-6中曲线7表明当BSA—DTT—SDBS三者混合时体系的共振光散射强度明显比BSA-SDBS二元配合物体系的共振光散射强度强。这一现象归因于还原剂DTT会破坏蛋白质的二硫键[12]促进了BSA与SDBS之间的结合而增强了体系的共振光散射强度。由于357 nm处的共振光散射强度比545 nm处的更强，因此本文选择357 nm作为共振光散射强度的测定波长。

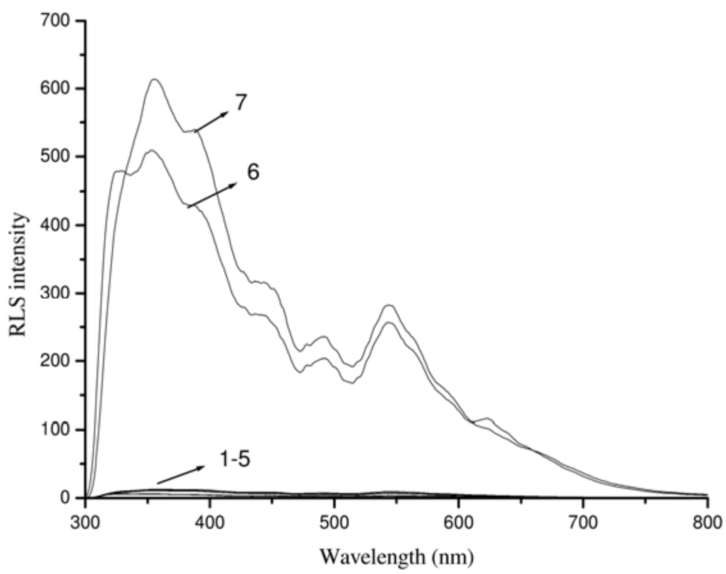

Fig.2-6 The RLS spectra of various systems 1．BSA ,2.DTT ,3.SDBS ,4. BSA-DTT ,5.DTT-SDBS ,6.BSA-SDBS 7.BSA-DTT-SDBS

2.3.2 条件的优化

2.3.2.1 酸度的影响

BSA和SDBS是通过静电作用力而结合的，所以体系的pH值对共振光散射强度的影响非常重要。本文采用磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲体系来控制反应体系的酸度，在c(BSA)= 4.5×10^{-7} molL^{-1}、c(DTT)=0.5 molL^{-1}和c(SDBS)=6.5×10^{-4}

$molL^{-1}$条件下研究了pH值变化对体系共振光散射强度的影响(图2-7)。由图2-7可知，DTT—SDBS体系的共振光散射强度很低，并随pH值的增大而没有明显的变化。BSA—DTT—SDBS体系共振光散射强度较高，并随pH值的增大而有明显的变化。当溶液的pH＜2.0时，BSA—DTT—SDBS体系的共振光散射强度随pH值的增大而增大，当pH在2.0～3.0范围内时达到最大值。BSA的等电点为I_0，pI_0=4.9，当pH＜pI_0（4.9）时BSA带正电荷与阴离子表面活性剂通过静电引力而很容易结合形成BSA—SDBS复合物。当pH＞4时共振光散射强度开始减弱，当pH=pI_0时共振光散射强度降低到与空白相近，并随pH值的增大而没有明显的变化，说明pH＞pI_0时BSA带负电荷，与阴离子表面活性剂发生静电排斥作用而很难结合形成BSA—SDBS复合物。基于实验结果，本文选用pH=2.4的缓冲溶液来控制反应体系的酸度。

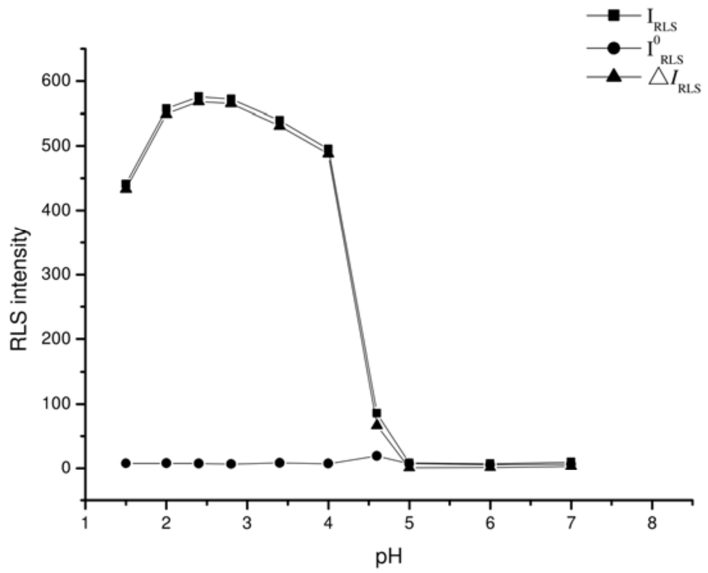

Fig. 2-7. Effect of pH value on RLS intensity

2.3.2.2 DTT 浓度的影响

DTT 的引入导致 BSA—SDBS 体系的共振光散射强度明显增强。本实验在pH=2.4，c(BSA)=$4.5\times10^{-7}$$molL^{-1}$和$c$(SDBS)= $6.5\times10^{-4}$$molL^{-1}$条件下，考查了DTT的浓度对体系的共振光散射强度的影响。结果如图2-8所示，DTT的浓度小于0.4 $molL^{-1}$时，体系的共振光散射强度随DTT浓度的增大而增强，DTT的浓

度在0.4～0.6 $molL^{-1}$范围内时达到最大值，DTT的浓度大于0.6 $molL^{-1}$时，随着DTT浓度的增加共振光散射强度减弱。因此本文选0.5 $molL^{-1}$为DTT的最佳浓度。

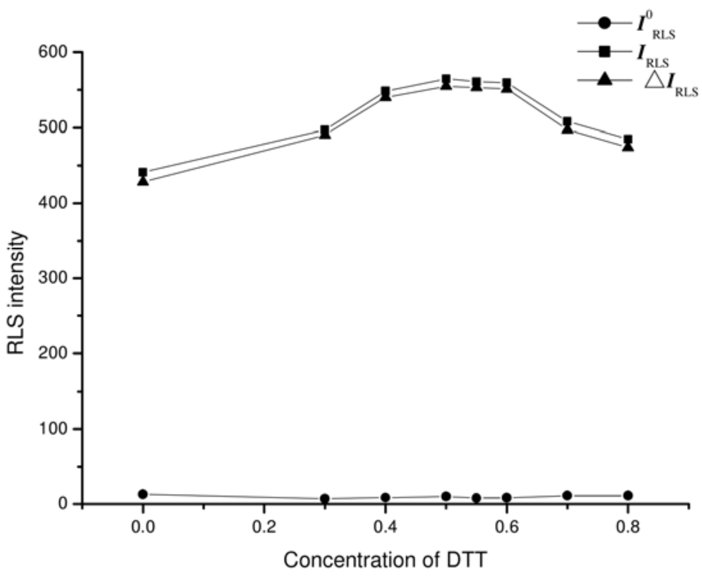

Fig.2-8. Effect of concentration of DTT on RLS intensity

2.3.2.3 SDBS 浓度的影响

由于体系的共振光散射强度增强是因为形成BSA—SDBS二元配合物引起的。实验中考察了SDBS浓度对BSA—DTT—SDBS体系共振光散射强度的影响。如图2-9所示，SDBS浓度改变并未引起DTT—SDBS体系共振光散射强度明显的变化。但SDBS浓度的变化引起BSA—DTT—SDBS体系共振光散射强度发生了明显的变化。当SDBS浓度小于5.0×10^{-4} $molL^{-1}$时，体系的共振光散射强度随着SDBS浓度的增大而增强。此时，浓度的增加有利于SDBS有效地联接BSA，形成较多的BSA—SDBS二元配合物。当SDBS的浓度大于6.0×10^{-4} $molL^{-1}$时，体系的共振光散射强度随SDBS浓度的增大而降低。SDBS是一种阴离子表面活性剂，作为变性剂和助溶剂，能断裂蛋白分子内和分子间的氢键，使分子去折叠，破坏蛋白质分子的二级三级结构[12]。SDBS在水溶液中以单体和多肽胶束的混合形式存在，能与蛋白质分子结合的仅是单体。当SDBS的浓度增大

到一定程度时，达到其胶束临界浓度。SDBS的浓度继续增大导致胶束的形成，降低了单体的浓度，从而与BSA结合的有效浓度减小，导致出现SDBS浓度增大体系共振光散射强度反而降低的现象[15]。当SDBS的浓度5.0×10^{-4} $molL^{-1}$～6.0×10^{-4} $molL^{-1}$范围时，体系的公正光散射强度达到且保持不变，基于上述讨论，本实验选择6.0×10^{-4} $molL^{-1}$作为SDBS的最佳浓度。

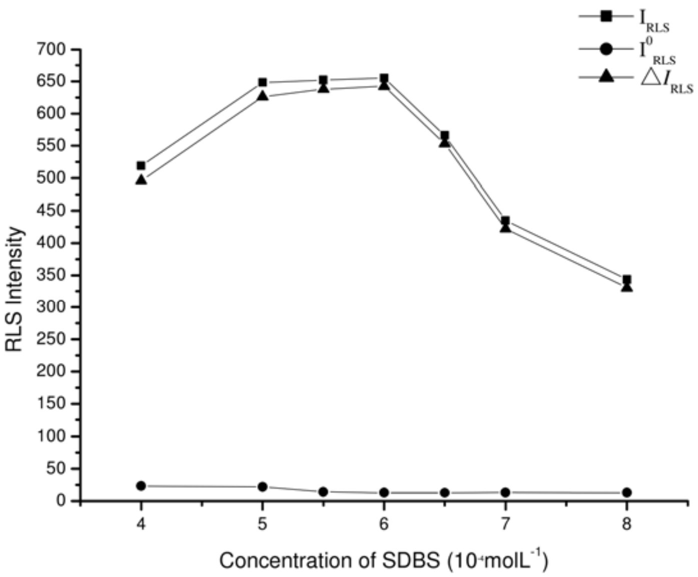

Fig.2-9. Effect of concentration of SDBS on RLS intensity

2.3.2.4 试剂加入顺序的影响

在体系的pH值以及BSA、DTT和SDBS浓度固定的条件下，考查了DTT与SDBS的加入顺序对体系共振光散射强度的影响。结果表明，在含有BSA的缓冲溶液中先加入DTT时体系共振光散射强度为100%，则先加入SDBS时体系共振光散射强度为87%，当体系中不加DTT, 在含有BSA的缓冲溶液中加入SDBS时体系的共振光散射强度为84%。此现象说明对体系共振光散射强度的增强DTT起着重要作用，能破坏氨基酸分子内或分子间的二硫键，促进BSA与SDBS更有效的结合。因此在实验中依次加入BSA、缓冲溶液、DTT和SDBS。

2.3.3 共存物质的影响

在选定的实验条件下，研究了多种常见金属离子和葡萄糖对 BSA（4.5×10^{-7}molL^{-1}）测定的影响。从表 2-3 可知，大多数共存离子对 BSA 的测定影响较小，都在±6%的相对误差之内。

Table 2-3 Influence of foreign substances

Foreign subustances	Concentration (×10^{-4} molL^{-1})	The concentration of BSA founded (×10^{-7}molL^{-1})	Relative error (%)
NaCl	1.0	4.31	-4.3
kCl	1.0	4.35	-3.4
$CaCl_2$	1.0	4.62	2.7
$MgSO_4$	1.0	4.37	-2.9
$ZnSO_4$	1.0	4.29	-4.7
$BaCl_2$	1.0	4.75	5.7
$Al_2(SO_4)_3$	0.05	4.73	5.2
Glucose	1.0	4.63	2.9

2.3.4 标准曲线

在最佳的实验条件下，体系的共振光散射强度随着 BSA 浓度的增大而增强，BSA 的浓度 c 在 1.0×10^{-8} molL^{-1}～7.5×10^{-7} molL^{-1} 范围时，与体系的共振光散射强度增强 ΔI_{RLS} 具有良好的线性关系。如图 2-10 所示，c 与 ΔI_{RLS} 的关系式可表示为：$\Delta I_{RLS} = -61.6+1.41\times10^9\ c$，相关系数为 0.9943，检出限为 5.0×10^{-9} molL^{-1}。

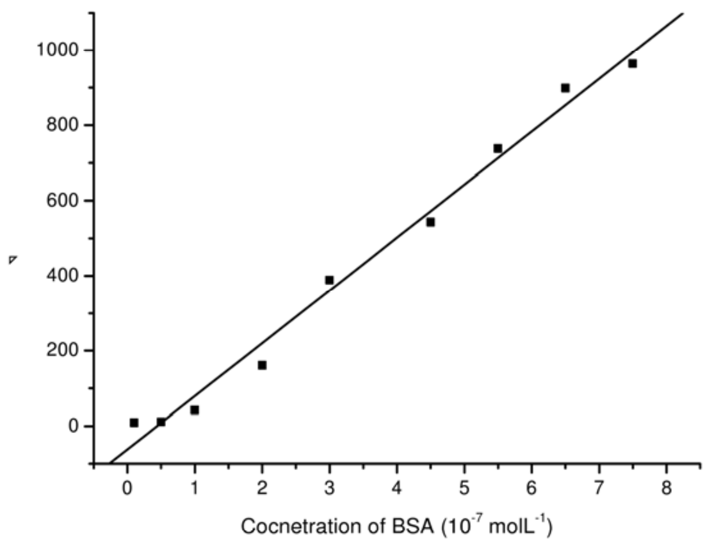

Fig2-10 The plot of ΔI_{RLS} value vs. concentration of BSA.

2.3.5 样品分析

2.3.5.1 合成样品的分析

为了证明方法的可行性，并考虑到生物样品中与蛋白共存的组分常有Na^+、K^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Cl^-、SO_4^{2-}等，且浓度都较高，所以合成了三种含有不同干扰组分的样品,按上述方法实验，结果如表2-4所示，测定结果与考马斯亮蓝法（CBB法）测得的结果一致，且有较好的回收率。

Table 2-4 Results for determination of BSA in synthetic samples

Foreign Substance[a]	The concentration of BSA found （$\times 10^{-7}$ molL^{-1}）		Recovery（%）		RSD （%）	
	RLS	CBB	RLS	CBB	RLS	CBB
NaCl $CaCl_2$ $BaCl_2$	5.92	6.16	98.7	102.7	-1.3	2.6
KCl $ZnSO_4$ $MgSO_4$	5.82	5.93	97.0	98.9	-3.0	-1.2
$CaCl_2$ $ZnCl_2$ $Al_2(SO_4)_3$	5.87	6.06	97.8	101.0	-2.2	1.0

The concentration of BSA in sample is 6.0×10^{-7}molL^{-1}.

[a] The concentrations of NaCl，KCl，$ZnSO_4$， $CaCl_2$， $MgSO_4$ ，$BaCl_2$ and $Al_2(SO_4)_3$ are 1.0×10^{-4}molL^{-1}，respectively.

2.3.5.2 人血清样品的分析

利用该方法对正常人血清（吉林大学第一附属医院提供）中的总蛋白质含

量进行了测定。测定前将新鲜的血清用二次蒸馏水逐级稀释500倍后分别取适量溶液，按实验方法进行测定，测定结果如表2-5表示，由表中数据可知，本法所得结果与经典的考马斯亮蓝法（CBB法）所得结果基本一致。

Table 2-5 Results for determination of total protein in human serum samples

Sample	RLS		CBB	
	c (g L^{-1})	R.S.D.(%)	c(g L^{-1})	R.S.D.(%)
1	29.0	2.6	29.9	2.3
2	70.3	2.8	74.2	2.6
3	82.4	3.7	83.2	3.1
4	86.6	3.3	83.4	3.5
5	89.7	3.3	83.2	2.8

2.4 小结

基于还原剂β- ME和DTT的还原特性，提出了一种以阴离子表面活性剂SDBS为共振光散射探针，测定BSA的共振光散射光谱法。还原剂β- ME和DTT的加入会增强体系的共振光散射强度，这一现象是由于还原剂β- ME和DTT能使半胱氨酸残基之间的二硫键断裂，使其分解为亚基，而促进BSA和SDBS的结合，引起体系共振光散射强度的增强。本章主要考查了反应体系的pH值、β-ME以及DTT和SDBS的浓度、反应物的加入顺序、共存离子等对体系共振光散射强度的影响。结果表明生物样品中与蛋白共存的大多数金属离子对BSA测定结果影响不大并在一定的浓度范围内，体系的共振光散射强度增强$\Delta \boldsymbol{I}_{RLS}$与BSA的浓度具有良好的线性关系。将该方法应用到合成样品和人血清样品中总蛋白质含量的分析，测定结果与用经典的考马斯亮蓝法（CBB法）测得的结果基本一致。

2.5 参考文献

[1] 汪家政，范明，等. 蛋白质技术手册[M]. 北京：科学出版社，2002：p38-50

[2] Yao G., Li K.A., Tong S.Y., Anal. Chim. Acta, 1999, 398, 319

[3] Wang M., Yang J.H., Wu X., et al., Anal. Chim. Acta, 2000, 422, 151

[4] Pasternack, R. F.; Bustamante, C.; Collings, P. J.; Giannetto, A.; Gibbs, E. J., Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique Journal of the American Chemical Society 1993, 115, 5393-5399.

[5] Pasternack, R. F.; Collings, P. J.,Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation Science 1995**,** 269, 935.

[6] Collings, P. J.; Gibbs, E. J.; Starr, T. E.; Vafek, O.; Yee, C.; Pomerance, L. A.; Pasternack, R. F., Resonance light scattering and its application in determining the size, shape, and aggregation number for supramolecular assemblies of chromophores. *Journal of* Physical Chemistry B 1999**,** 103, (40), 8474-8481.

[7] Li, Y. F.; Shu, W. Q.; Feng, P.; Huang, C. Z.; Li, M., Determination of DNA with cetyltrimethylammonium bromide by the measurement of Resonance Light Scattering. Analytical Sciences 2001**,** 17, (6), 693-696.

[8] Liu, R. T.; Yang, J. H.; Sun, C. X.; Wu, X.; Gao, X. B.; Liu, Y.; Liu, S. F.; Su, B. Y., Resonance double light scattering method for the determination of nucleic acids with cetylpyridine bromide. Microchimica Acta 2004**,** 147, (1-2), 105-109.

[9] Chen, Y.-j.; Yang, J.-h.; Wu, X.; Wu, T.; Luan, Y.-x., Resonance light scattering technique for the determination of proteins with resorcinol yellow and OP. Talanta 2002**,** 58, (5), 869-874.

[10] Wu, X.; Sun, S.; Guo, C. Y.; Yang, J. H.; Sun, C. X.; Zhou, C. R.; Wu, T., Resonance light scattering technique for the determination of proteins with Congo red and Triton X-100. Luminescence 2006**,** 21, (1), 56-61.

[11] 陆健. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京：.化学工业出版社, 2005:p181-182

[12] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社，2005:p92-94

[13] Gao D J, He N, Tian Y, Chen Y H, Zhang H Q, Yu A M. Spectrochim. Acta: Part A [J] , 2007, 68 : 573.

[14] JIANG Bo,HU Qing-hong. Analytical Laboratory [J], 2002 , 21(3) : 27.

[15] 韩丙勇，张学军，等译. 水溶液中的表面活性剂和聚合物[M]. 北京:化学工业出版社，2005：32

第三章　以硫酸铵为探针检测蛋白质的共振光散射光谱法研究

蛋白质是包括人类在内的各种生物有机体的重要组成成分，是生命的物质基础之一。生物体的生长、发育、遗传和繁殖等一切生命活动都离不开蛋白质。蛋白质对调节生理功能、维持新陈代谢起着及其重要的作用。在生命活动中蛋白质无处不在，因此研究蛋白质有着极为重要的生物学意义。

蛋白质的含量测定是生物化学研究中最常用、最基本的分析方法之一。常用的经典方法有定氮法、双缩脲法（Biuret法）、Folin-酚试剂法（Lowry法）、紫外吸收法、考马氏亮蓝法和荧光法等[1-5]。

Pastenack等[6-8]首次将共振光散射光谱作为一种技术研究卟啉类化合物在核酸分子上的堆积。指出入射光与粒子相互作用时，入射光的频率接近其吸收频率，粒子对光的散射程度明显增强。即当入射光的波长接近分子最大吸收波长时，散射微粒对光的散射程度明显的增强。自此以后，共振光散射技术由于其高灵敏性、操作简单、采用普通光源就可以实现等优点被广泛的应用于生物大分子、药物分子、无机离子等的测定。目前测定蛋白质的共振光散射探针主要有卟啉类、染料类、纳米粒子等[9-15]。染料分子、金属纳米粒子在痕量蛋白质存在的条件下发生聚集，体系的共振光散射强度会发生明显的增强，且增强的共振光散射强度与蛋白质的浓度在一定浓度范围内具有良好的线性关系，据此原理建立测定蛋白质的共振光散射光谱法。

本章基于硫酸铵能与蛋白质发生盐析作用，促进蛋白质分子凝聚，形成蛋白质沉淀而引起体系共振光散射强度的增强，建立了一种前人未曾研究过的以硫酸铵为蛋白质的共振光散射探针，快速简便检测蛋白质的新方法。硫酸铵具有盐析效应强、pH范围广、溶解度大、受温度影响小、溶液散热少和经济适用[16]等优点，在蛋白质的盐析中使用最广泛。本章具体研究了以硫酸铵为共振光散射探针提出了检测牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)和卵清白蛋白(OVA)的方法，考查了体系的酸度、硫酸铵的浓度和共存离子等对体系共振光

散射强度的影响。将所建立的测定蛋白质的共振光散射光谱法应用到合成样品及实际样品的测定，测定结果与用经典的考马斯亮蓝法测得的结果基本一致。

3.1 实验部分

3.1.1 仪器与试剂

3.1.1.1 仪器

RF-5301 PC荧光分光光度计（日本岛津公司）、GBC Cintra 10e 紫外-可见分光光度计（澳大利亚GBC仪器公司）、DELTA 320 pH计（上海梅特勒-托利多仪器有限公司）。

3.1.1.2 试剂

1.0×10^{-5} $molL^{-1}$BSA、HSA、OVA（购自上海生物制品有限公司）储备液用二次水配制，并在4℃下保存；将767g无水硫酸铵缓慢溶于1L二次水，配置硫酸铵储备液。此时硫酸铵的饱和度定为100%，相当于4 $molL^{-1}$的浓度，使用时用水稀释此饱和硫酸铵溶液可得到不同饱和度的硫酸铵溶液。饱和硫酸铵溶液的pH值在4.5～5.5范围内，使用时可用$NH_3{\cdot}H_2O$和H_2SO_4调节溶液的酸度。实验所用试剂均为分析纯。

3.1.2 实验方法

在10 mL比色管中分别加入适量的BSA、HSA和OVA储备液，再加入适量的饱和$(NH_4)_2SO_4$溶液，最后用二次去离子水定容，放置20min后进行测定。

3.1.3 仪器参数

采用RF-5301 PC荧光分光光度计，在220 nm～800 nm 波长范围内同步扫描($\lambda ex = \lambda em$)，激发和发射狭缝均为3 nm。在最大共振光散射波长处测量样品液（蛋白质—硫酸铵溶液）的共振光散射强度I_{RLS}和空白（硫酸铵溶液）的共振光散射强度 I^0_{RLS} ，由测得的I_{RLS}和I^0_{RLS}，可得到增强的共振光散射强度ΔI_{RLS}，即$\Delta I_{RLS} = I_{RLS} - I^0_{RLS}$。

3.2 结果与讨论

3.2.1 蛋白质—$(NH_4)_2SO_4$体系的光谱特征

由图 3-1 可知，$(NH_4)_2SO_4$、BSA、HSA 和 OVA 体系的共振光散射强度较弱，而 OVA—$(NH_4)_2SO_4$、BSA—$(NH_4)_2SO_4$和 HSA—$(NH_4)_2SO_4$体系的共振光散射强度均较强。这一现象归因于蛋白质的盐析作用。在高浓度中性盐存在下，蛋白质等生物大分子物质在水溶液中的溶解度降低而产生沉淀，称盐析作用[17]。蛋白质等生物大分子物质以一种亲水胶体形式存在于水溶液中，无外界影响时，呈稳定的分散状态，其主要原因是:第一，蛋白质为两性物质，一定 pH 值下表面显示一定的电性，由于静电斥力作用，使分子间相互排斥。第二，蛋白质分子周围，水分子成有序排列，在其表面上形成了水化膜，水化膜层能保护蛋白质粒子，避免其因碰撞而聚沉。产生盐析作用的一个原因是由于盐离子与蛋白质表面具相反电性的离子基团结合，形成离子对，因此盐离子部分中和了蛋白质的电性，使蛋白质分子之间静电排斥作用减弱而能相互靠扰，聚集起来。盐析作用的另一个原因是由于中性盐的亲水性比蛋白质大，盐离子在水中发生水化而使蛋白质脱去了水化膜，暴露出疏水区域，由于疏水区域的相互作用，使蛋白质分子之间聚集而沉淀[18]，从而引起了体系的共振光散射强度的增强。由图 3-2 可知，OVA-$(NH_4)_2SO_4$、BSA-$(NH_4)_2SO_4$和 HSA-$(NH_4)_2SO_4$混合体系在 250nm～300nm 波长范围内有吸收。由共振光散射理论[19，20]可知，320nm 处的散射峰应该是体系的共振光散射峰。本文选择 320 nm 作为共振光散射强度的测定波长。

3.2.2 条件的优化

3.2.2.1 酸度的影响

蛋白质是具有等电点的两性电解质。一般来说，蛋白质分子表面所带的静电荷越多，它的溶解度越大。当外界环境使其表面静电荷为零时，溶解度将达到一个相对的最低值。所以调节溶液的 pH 值可以改变蛋白质的溶解度[17]。本章采用 $NH_3 \cdot H_2O$ 和硫酸控制饱和硫酸铵溶液的酸度，研究了 pH 1.0～7.0 范围内体系共振光散射强度的变化。其变化曲线如图 3-3（A、B、C）表示。在没有蛋白质（BSA、HSA、OVA）存在的条件下，$(NH_4)_2SO_4$溶液的共

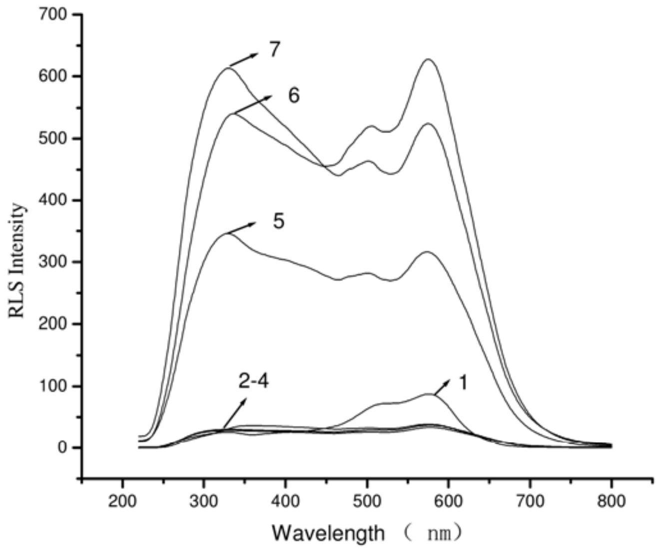

Fig.3-1 The RLS spectra of various systems 1.$(NH_4)_2SO_4$ 2. HSA 3. BSA 4. OVA 5. OVA-$(NH_4)_2SO_4$. 6. BSA-$(NH_4)_2SO_4$ 7. HSA-$(NH_4)_2SO_4$.

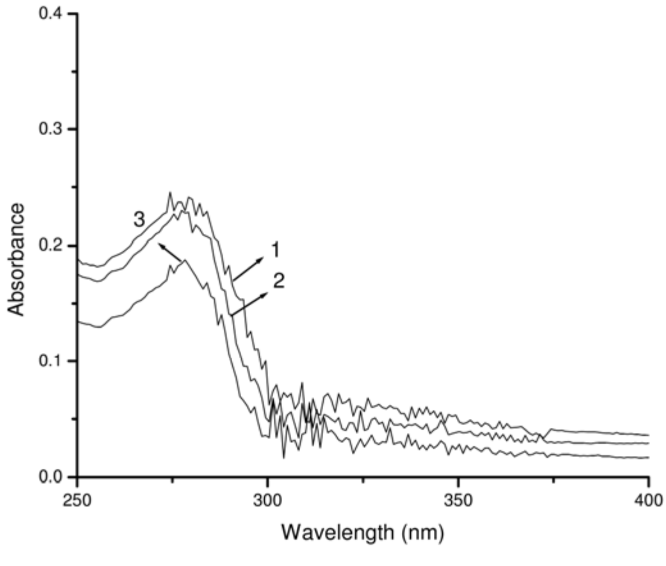

Fig.3-2 The absorption spectra of various system

1, BSA- $(NH_4)_2SO_4$ system.The concentration of BSA is 4.0×10^{-6} mol·L^{-1}, The saturation of $(NH_4)_2SO_4$ is 60%.

2, HSA—$(NH_4)_2SO_4$system .The concentration of HSA is 4.0×10^{-6} mol·L^{-1}, The saturation of $(NH_4)_2SO_4$ is 60%.

3, OVA—$(NH_4)_2SO_4$ system.The concentration of OVA is 2.0×10^{-6} mol·L^{-1}, The saturation of $(NH_4)_2SO_4$ is 80%.

振光散射强度不高且强度不随 pH 值的变化而改变。然而当蛋白质（BSA、HSA、OVA）和$(NH_4)_2SO_4$共存时体系的共振光散射强度较强并随 pH 值的变化而有明显的变化。BSA—$(NH_4)_2SO_4$、HSA—$(NH_4)_2SO_4$和 OVA—$(NH_4)_2SO_4$体系的共振光散射强度出现最大值且基本保持不变的 pH 值范围分别为 2.5～3.0、2.0～4.0 和 3.0～3.5。盐析的 pH 值选择要以不降低蛋白质的活力为原则。由于蛋白质在等电点时最易沉淀，所以调整选择蛋白质溶液的 pH 值于沉淀目的物等电点附近进行盐析。但蛋白质等高分子化合物的表观等电点受介质环境的影响。在高盐溶液中，分子表面电荷分布会发生变化，等电点往往发生偏移。与负离子结合的蛋白质，其等电点常向酸侧移动[17]。对于 BSA—$(NH_4)_2SO_4$、HSA—$(NH_4)_2SO_4$和 OVA—$(NH_4)_2SO_4$体系，本文选用的 pH 值分别为 3.0、4.0 和 3.5。

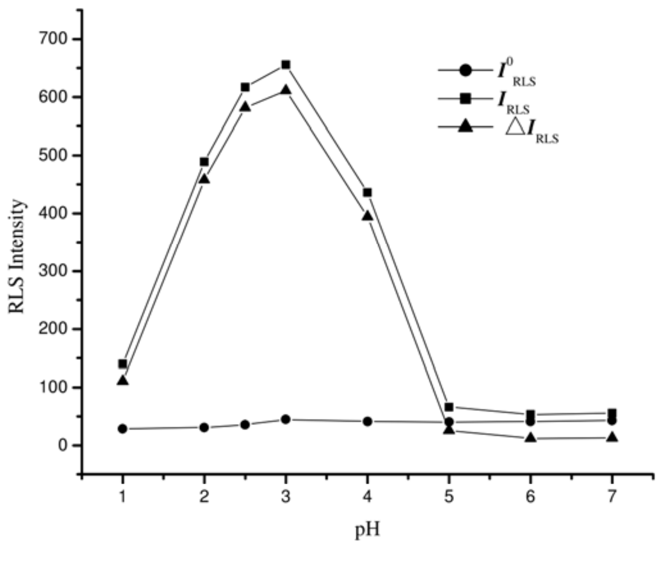

Fig.3-3(A) Effect of pH value on RLS intensity of BSA-$(NH_4)_2SO_4$ system.
The saturation of $(NH_4)_2SO_4$ is 60%.

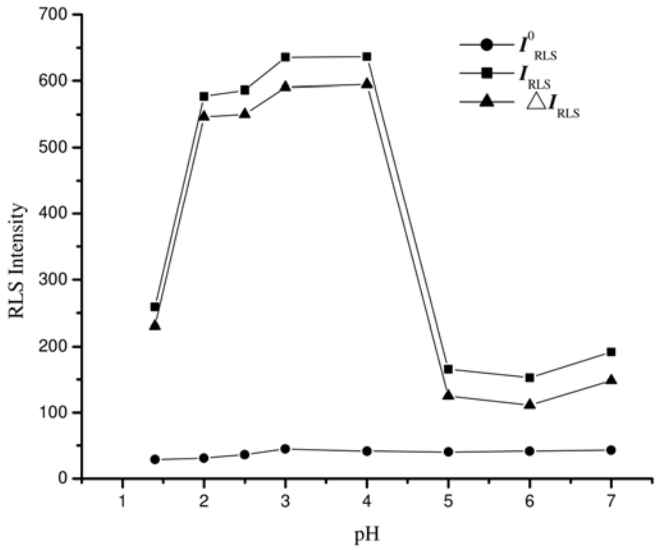

Fig.3-3(B) Effect of pH value on RLS intensity of HSA-$(NH_4)_2SO_4$ system.
The saturation of $(NH_4)_2SO_4$ is 60%.

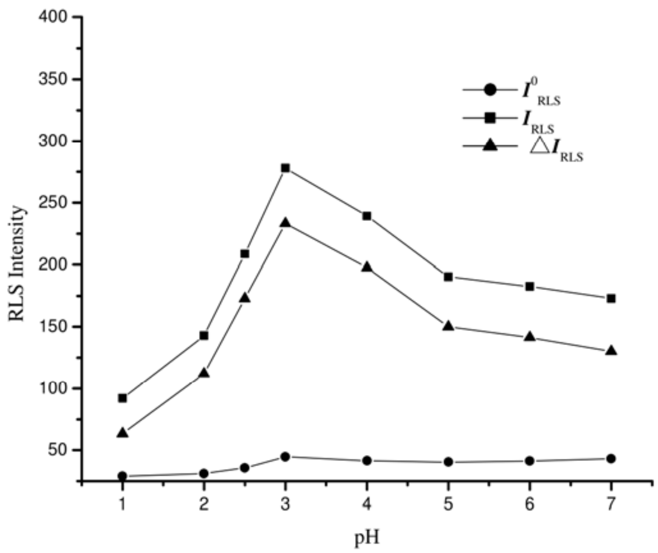

Fig3-3(C) Effect of pH value on RLS intensity of OVA-$(NH_4)_2SO_4$ system.
The saturation of $(NH_4)_2SO_4$ is 80%.

3.2.2.2 $(NH_4)_2SO_4$饱和度的影响

本实验考查了$(NH_4)_2SO_4$溶液的饱和度对体系共振光散射强度的影响。结果如图 3-4（A、B、C）所示。在 BSA-$(NH_4)_2SO_4$体系和 HSA-$(NH_4)_2SO_4$体

系中$(NH_4)_2SO_4$溶液的饱和度均为60%时体系的共振光散射强度出现最大值，在OVA-$(NH_4)_2SO_4$体系中 $(NH_4)_2SO_4$溶液的饱和度为80%时体系的共振光散射强度出现最大值。

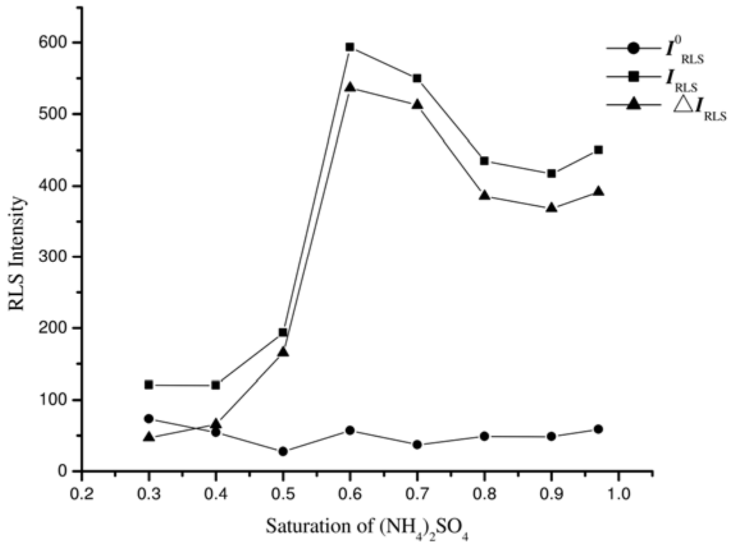

Fig.3-4（A） Effect of $(NH_4)_2SO_4$ saturation on RLS intensity of BSA-$(NH_4)_2SO_4$ system.The pH value is 3.

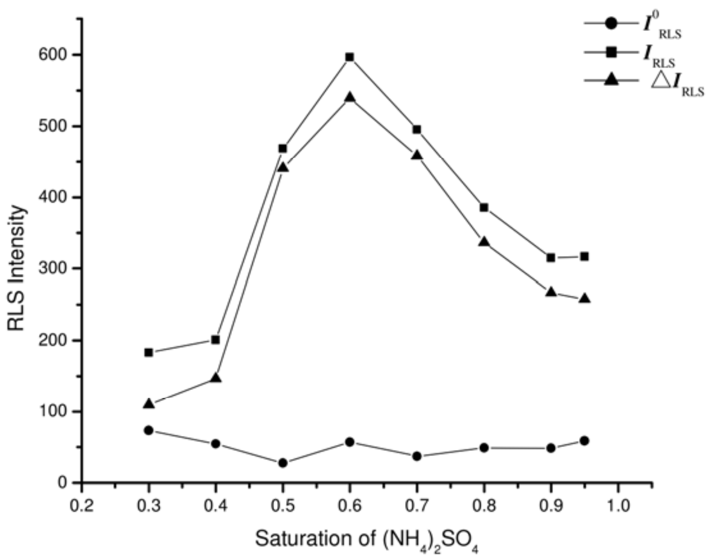

Fig.3-4(B) Effect of $(NH_4)_2SO_4$ saturation on RLS intensity of HAS-$(NH_4)_2SO_4$ system.The pH value is 4.

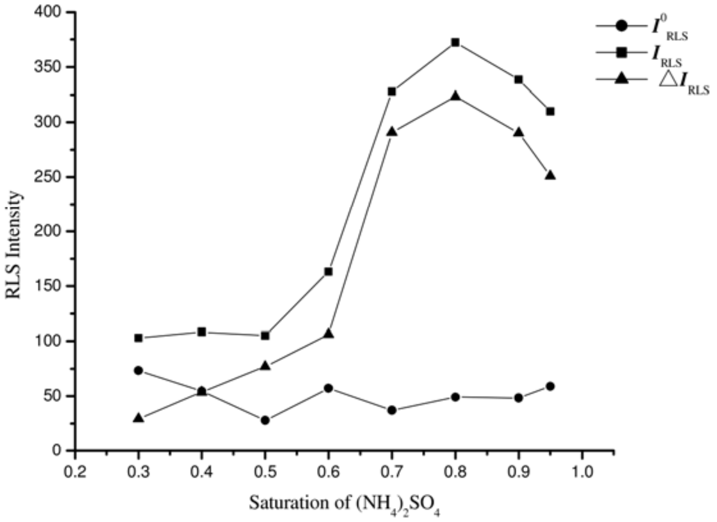

Fig.3-4(C) Effect of $(NH_4)_2SO_4$ saturation on RLS intensity of OVA-$(NH_4)_2SO_4$ system.The pH value is 3.

3.2.2.3 共存物质的影响

在选定的实验条件下，研究了多种常见金属离子和葡萄糖对三种蛋白质（BSA、HSA 和 OVA 溶液的浓度均为 $3.0\times10^{-7}molL^{-1}$）测定的影响。从表 3-1 可知，大多数共存离子对三种蛋白质的测定影响较小，都在±8%的相对误差之内。

Table 3-1 Influence of foreign substances

Foreign substances[a]	Relative error(%)		
	BSA	HSA	OVA
K^+	-7.48	-3.37	2.73
Na^+	-0.76	4.06	7.45
Ca^{2+}	1.21	2.54	3.32
Cu^{2+}	4.39	1.07	4.13
Mg^{2+}	2.51	1.75	3.05
Zn^{2+}	0.45	0.82	0.73
Al^{3+}	2.43	5.04	-4.65
Glucose	2.47	3.06	5.83

[a.] All the concentrations of coexistence substances are 1.0×10^{-4} mol·L^{-1}.

3.2.2.4 标准曲线

在最佳实验条件下，蛋白质浓度的增强引起体系共振光散射强度的增强。

BSA、HSA和OVA的浓度与体系的共振光散射强度的增强具有良好的线性关系。如表3-2所示，

Table 3-2 Linear calibration curves and detection limits for the determination of BSA, HSA and OVA

Protein	Linear range (mol • L^{-1})	Linear regression equation(c, mol • L^{-1})	r	Detection limit (S/N=3)
BAS	5.0×10^{-8}～1.0×10^{-6}	$\Delta I=47.81+6.17\times10^{8}c$	0.998	6.6×10^{-9}
HSA	2.5×10^{-8}～8.0×10^{-7}	$\Delta I=95.51+1.10\times10^{9}c$	0.999	3.8×10^{-9}
OVA	5.0×10^{-8}～1.5×10^{-6}	$\Delta I=107.76+5.58\times10^{8}c$	0.997	7.4×10^{-9}

3.2.3 样品分析

3.2.3.1 合成样品的分析

按照上述测定蛋白质的共振光散射光谱法，对几种合成样品进行了分析。结果如表 3-3 所示，测定结果与用经典的考马斯亮蓝法测得的结果一致。

Table 3-3 Results for determination of protein in synthetic samples

Protein[a]	Foreign Substance[b]	The concentration of protein Found($\times10^{-7}$ molL^{-1})		Recovery(%)		RSD(%)	
		RLS	CBB	RLS	CBB	RLS	CBB
BSA	K^{+}、Na^{+}、Mg^{2+} Zn^{2+}、Ag^{+}	2.92	3.03	97.3	101.0	2.67	1.0
HSA	K^{+}、Na^{+}、Mg^{2+} Zn^{2+}、Ag^{+}	3.05	3.05	102.0	102.0	1.67	1.7
OVA	K^{+}、Na^{+}、Mg^{2+} Zn^{2+}、Ag^{+}	3.04	3.02	101.0	101.0	1.33	0.6

a. All the concentrations of protein in sample is 3×10^{-7}molL^{-1}.
b.All the concentrations of coexistence substances are 1.0×10^{-4} mol·L^{-1}.

3.2.3.2 实际样品的分析

利用该方法对正常人血清（吉林大学第一附属医院提供）中的总蛋白质含

量进行了测定。测定前将新鲜的血清用二次蒸馏水逐级稀释500倍后分别取适量溶液，按实验方法进行测定，测定结果如表3-4表示，由表中数据可知，本法所得结果与经典的考马斯亮蓝法所得结果基本一致。

Table 3-4 Results for determination of total protein in human serum samples

Sample	RLS		CBB	
	C(g L^{-1})	R.S.D.(%)	C(g L^{-1})	R.S.D.(%)
1	70.86	1.82	67.36	4.24
2	74.02	2.58	70.93	2.66
3	50.32	2.09	49.07	2.30
4	79.90	1.75	77.64	1.88
5	99.33	1.63	96.71	1.96

3.3 小结

研究了蛋白质（BSA、HSA 和 OVA）—$(NH_4)_2SO_4$ 体系的共振光散射光谱及其分析应用。研究结果表明$(NH_4)_2SO_4$ 与蛋白质因盐析作用而使蛋白质沉淀，引起体系的共振光散射强度的增强。将中性盐加入到蛋白质溶液中，蛋白质的溶解度开始增大，但随着继续加入盐，蛋白质的溶解度却逐步减小，高浓度的盐离子有很强的水化力，可夺取蛋白质分子的水化层，使之“失水”，于是蛋白质胶粒凝结并沉淀析出[18]。基于$(NH_4)_2SO_4$ 使蛋白质沉淀而使体系共振光散射强度增强的效应，建立了一种快速、简便、灵敏的测定蛋白质的共振光散射光谱法。具体考察了体系的酸度、$(NH_4)_2SO_4$ 浓度和共存离子对体系共振光散射强度的影响。结果表明生物样品中与蛋白共存的大多数金属离子对 BSA 测定结果影响不大。在一定的浓度范围内，体系的共振光散射强度增强 $\Delta \boldsymbol{I}_{RLS}$ 与蛋白质的浓度具有良好的线性关系。将该方法应用到合成样品和人血清样品中总蛋白质含量的分析，结果与经典的考马斯亮蓝法基本一致。

3.4 参考文献

[1] 陈钧辉，陶力，李俊, 等. 生物化学实验[M]. 北京:科学出版社, 2006: p 51-63.

[2] Li, N.; Li, K. A.; Tong, S. Y., Fluorometric Determination for Micro Amounts of Albumin and Globulin Fractions without Separation by Using α,β,γ,δ -Tetra (4' -carboxyphenyl) porphin *Analytical Biochemistry* 1996**,** 233,

151-155.

[3] Liu, H.; Cho, B.-Y.; Krull, I. S.; Cohen, S. A., Homogeneous fluorescent derivatization of large proteins. *Journal of Chromatography A* 2001**,** 927, (1-2), 77-89.

[4] Ma, C. Q.; Li, K. A.; Tong, S. Y., Determination of proteins by fluorescence quenching of erythrosin B. *Analytica Chimica Acta* 1996**,** 333, (1-2), 83-88.

[5] Kessler, M. A.; Meinitzer, A.; Wolfbeis, O. S., Albumin Blue 580 Fluorescence Assay for Albumin. *Analytical Biochemistry* 1997**,** 248, (1), 180-182.

[6] Pasternack, R. F.; Bustamante, C.; Collings, P. J.; Giannetto, A.; Gibbs, E. J., Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique *Journal of the American Chemical Society* 1993**,** 115, 5393-5399.

[7] Pasternack, R. F.; Collings, P. J.,Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation *Science* 1995**,** 269, 935.

[8] Collings, P. J.; Gibbs, E. J.; Starr, T. E.; Vafek, O.; Yee, C.; Pomerance, L. A.; Pasternack, R. F., Resonance light scattering and its application in determining the size, shape, and aggregation number for supramolecular assemblies of chromophores. *Journal of Physical Chemistry B* 1999**,** 103, (40), 8474-8481.

[9] Huang, C. Z.; Li, Y. F.; Mao, J. G.; Tan, D. G., Determination of protein concentration by enhancement of the preresonance light-scattering of α,β,γ,δ-tetrakis(5-sulfothienyl)porphine. *The Analyst* 1998, 123, 1401-1406.

[10] Chen, Y.-j.; Yang, J.-h.; Wu, X.; Wu, T.; Luan, Y.-x., Resonance light scattering technique for the determination of proteins with resorcinol yellow and OP. *Talanta* 2002, 58, (5), 869-874.

[11] Guo, Z.-X.; Shen, H.-X., A highly sensitive assay for protein using resonance light-scattering technique with dibromohydroxyphenylfluorone-molybdenum(VI) complex. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 1999**,** 55, (14), 2919-2925.

[12] Li, L.; Song, G.; Fang, G., Determination of bovine serum albumin by a

resonance light-scattering technique with the mixed-complex La(Phth)(phen)$^{3+}$. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006**,** 40, (5), 1198-1201.

[13] Liu, R.; Yang, J.; Wu, X.; Lan, Z., Resonance double light scattering method for the determination of proteins with morin-CTMAB. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2002**,** 58, (14), 3077-3083.

[14] Wang, L.; Xu, F.; Zhou, Y.; Wang, L.; Liu, Y., Preparation and application of MS-M^{2+} nanoparticles as a novel resonance light-scattering probe. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2004**,** 60, (8-9), 2141-2145.

[15] Fang, B.; Gao, Y. C.; Li, M. G.; Wang, G. F.; Li, Y. X., Application of functionalized Ag nanoparticles for the determination of proteins at nanogram levels using the resonance light scattering method. Microchimica Acta 2004**,** 147, (1-2), 81-86.

[16] 汪家政，范明, 等. 蛋白质技术手册[M]. 北京：科学出版社，2000 ：p 65-67.

[17] 欧阳平凯，胡永红, 等. 生物分离原理及技术[M]. 北京：化学工业出版社，1999：p282

[18] 陆健. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京：化学工业出版社， 2005：p 22-24

[19] Miller, G. A., Fluctuation Theory of the Resonance Enhancement of Rayleigh Scattering in Absorbing Media. *The Journal of Physical Chemistry* 1977**,** 82, (5), 616-618.

[20] Pasternack, R. F.; Bustamante, C.; Collings, P. J.; Giannetto, A.; Gibbs, E. J., Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique Journal of the American Chemical Society 1993**,** 115, 5393-5399.

致　谢

本论文的工作是在导师张寒琦教授的精心指导下完成的。从论文的选题、实验设计、以及论文的撰写到论文最后的完成都凝结着张老师的智慧和心血。真诚的感谢张老师在生活和学业上给予的无私帮助和指导。

真诚的感谢于爱民、张忆华、田媛、师宇华、汪子明、宋大千、丁兰、等老师在论文完成中给予的无私支持和帮助。

感谢高德江、吴立航、孙艳涛、王璐、乔春玉、邓新煜、程建华、李丹、汤洁丽、王丽英、孟祥哲、李红梅、王雪、刘丽佳等同学在实验过程中给予的无私帮助。

感谢多年来一直默默支持我的家人。

谨以此文，向所有关心和帮助过我的老师、同学和亲人致敬！

附　录

作者简介：

姓名：牧　丹　　　　　　　　　　性别：女

出生年月日：1979.01.16　　　　　籍贯：内蒙古赤峰市

1997.09-2001.07　　内蒙古师范大学，化学教育专业，本科

2001.09-2006.07　　内蒙古锡林郭勒盟，中学化学任课教师

2006.09-2009.06　　吉林大学化学学院分析化学系，硕士研究生

作者攻读硕士学位期间的科研成果：

1. **牧丹**，吴立航，高德江，孙艳涛，邓新煜，田媛，张寒琦；牛血清白蛋白的共振光散射光谱法研究；分析科学学报；2008，24（06）：685-688.
2. LihangWu, **Dan Mu**, Dejiang Gao, Xinyu Deng, Yuan Tian, Hanqi Zhang, Aimin Yu[*]. Determination of protein by resonance light scattering technique using dithiothreitol–sodium dodecylbenzene sulphonate as probe. Spectrochimica Acta Part A 72 (2009) 178−181.
3. Yantao Sun[a,b], Shuyun Bi [c], Daqian Song[a], Chunyu Qiao [a],**Dan Mu[a]**, Hanqi Zhang [a,*]. Study on the interaction mechanism between DNA and the main active components in *Scutellaria baicalensis* Georgi. Sensors and Actuators B 129 (2008) 799−810.
4. Lihang Wu, **Dan Mu**, Hanqi ZHANG, Aimin YU[*]. Determination of protein by resonance light scattering technique using ammonium sulfate. Spectrochimica Acta Part A in press.

蛋白质的共振光散射光谱法研究

摘要

作者：牧 丹

导师：张寒琦 教授

专业：分析化学

蛋白质是包括人类在内的各种生物有机体的重要组成成分，是生物性状的直接表达者，担负着各种生理功能。生物体的生长、发育、遗传和繁殖等一切生命活动都离不开蛋白质。蛋白质对调节生理功能、维持新陈代谢起着及其重要的作用。目前蛋白质的定量分析方法主要是分光光度法和荧光法。分光光度法灵敏度较低，荧光光度法仅限于荧光体系。深入研究小分子物质与蛋白质的作用机理，建立蛋白质的快速、简便、高灵敏的分析方法是当前生物分析化学研究的前沿和热点之一。共振光散射光谱法是二十世纪九十年代发展起来的一种新兴的痕量分析测试新方法。1993 年，共振光散射技术作为一种研究生色团聚集的方法被正式提出。随着共振光散射技术在理论和分析方法上的日趋成熟，在生命科学、环境科学以及纳米材料研究等方面已经得到了越来越多的应用。本论文对共振光散射技术进行了概述，建立了三种测定蛋白质的共振光散射光谱法。

在共振光散射技术中，表面活性剂主要用来提高体系共振光散射的强度。对于阴离子表面活性剂和蛋白质体系的共振光散射光谱的研究已有报道，本文第二章在此基础上研究了强还原剂（β-巯基乙醇、二硫苏糖醇等）对蛋白质和阴离子表面活性剂十二烷基苯磺酸钠体系共振光散射强度的影响，证实了使用强还原剂能使半胱氨酸残基之间的二硫键断裂，促进牛血清白蛋白与十二烷基苯磺酸钠之间的结合而可提高体系信号和方法的灵敏度。研究了牛血清白蛋白—β-巯基乙醇—十二烷基苯磺酸钠体系和牛血清白蛋白—二硫苏糖醇—十二烷基苯磺酸钠体系的共振光散射光谱并建立了两种测定蛋白质的共振光散射

光谱法。系统地考查了各种因素对体系共振光散射强度的影响，如酸度、时间、还原剂的浓度、表面活性剂的浓度和试剂加入顺序等。将所建立的测定蛋白质的方法应用到合成样品和实际样品的分析，并与传统的考马斯亮蓝法比较，结果令人满意。

本文第三章基于硫酸铵（$(NH_4)_2SO_4$）能与蛋白质发生盐析作用，促进蛋白质分子凝聚，形成蛋白质沉淀而引起体系共振光散射强度的增强，建立了一种以硫酸铵为蛋白质的共振光散射探针，检测蛋白质的新方法。硫酸铵是一种最常用的蛋白质沉淀剂，因为它有一些优良性质，如盐析的有效性、pH范围广、溶解度高、溶液散热少和经济适用等。本章研究了牛血清白蛋白—硫酸铵、人血清白蛋白—硫酸铵和卵清白蛋白—硫酸铵体系的共振光散射光谱，考查了体系的酸度、硫酸铵的饱和度和共存离子等对体系共振光散射强度的影响。将所建立的测定蛋白质的共振光散射光谱法应用到合成样品及实际样品的分析并与传统的考马斯亮蓝法比较，结果令人满意。

关键词：

共振光散射光谱法，蛋白质，还原剂，阴离子表面活性剂，$(NH_4)_2SO_4$

studies on proteins by resonance light scattering spectrometry

Abstract

Author：Mu Dan

Supervisor：Prof. Zhang Hanqi

Major: Analytical Chemistry

Protein is the most important life substance and plays an important role in animal life, such as poviding power, serving as the carrier of drug, microorganism and minerals. The amount of protein in human body is a reference for health. Therefore,to quantify protein in biochemistry is very important, which attracts the attentions of many scientists. The detection method of biomactomolecule has developed rapidly and become the important field of life science. The common analytical methods mainly include spectrophotometry and fluorimetry.Spectrophotometry suffers from low sensitivity. Fluorimetry is restricted by fluorimetric reagents. The scientists focus on finding a simple, quick and high sensitive method to determine the protein. Resonance light scattering spectrometry is a new technology which developed in 1990s for trace analysis. It was founded by pasternalk et al. in 1993. There have been more and more researches and applications of RLS recently. With high sensitivity, simplicity and rapidness, RLS has been applied widely in the fields of life sciences, environmental sciences and the investigation of nanometer materials. In this thesis, the assay for protein and the interaction between protein and probe were studied by resonance light scattering (RLS) technique.

The surfactant always cooperates with RLS probe to enhance the RLS signal of system in the RLS technique for determination of proteins. In this thesis, the reduction agents (dithiothreitol and β-mercaptoethanol) were introduced to the bovine serum albumin -sodium dodecylbenzene sulphonate system. Strong reduction agents can break down disulfide bond between cysteine amino acid residues and degrade protein. After the reduction agent was added into bovine serum albumin solution, the RLS intensity of bovine serum albumin -sodium dodecylbenzene sulphonate was enhanced. Based on the above results, a new assay for protein was established. The effects of some experimental conditions on the enhanced RLS intensity, such as concentrations of reduction agent and surfactant, pH values, coexistence ions and so on were investigated. Compared with the results obtained by Coomassie Brillant Blue(CBB) method, the experimental results obtained by the proposed method were satisfactory.

Based on the phenomenon that $(NH_4)_2SO_4$ can form large particles with protein by electrostatic forces to enhance the intensity of resonance light scattering (RLS), $(NH_4)_2SO_4$ was used as a RLS probe to determine bovine serum alumin (BSA), human serum alumin (HSA) and ovum albumin (OVA). The experimental conditions were investigated, including the acidity and saturation of $(NH_4)_2SO_4$. The effect of foreign substances was also examined. The real sample and synthetic samples were analyzed and the results were satisfactoriy.

Keywords:

Resonance light scattering; Protein; Reduction agent; Anionic surfactant; $(NH_4)_2SO_4$